

## Tesis de Posgrado

# Modulación de la memoria y osmorregulación en chasmagnathus : relación funcional y papel del sistema angiotensinérgico

Delorenzi, Alejandro

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Delorenzi, Alejandro. (1999). Modulación de la memoria y osmorregulación en chasmagnathus : relación funcional y papel del sistema angiotensinérgico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3271\\_Delorenzi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3271_Delorenzi.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Delorenzi, Alejandro. "Modulación de la memoria y osmorregulación en chasmagnathus : relación funcional y papel del sistema angiotensinérgico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3271\\_Delorenzi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3271_Delorenzi.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES



MODULACIÓN DE LA MEMORIA Y OSMORREGULACIÓN EN  
*CHASMAGNATHUS*: RELACIÓN FUNCIONAL Y PAPEL DEL SISTEMA  
ANGIOTENSINÉRGICO.

Autor: Lic. Alejandro Delorenzi

Director: Dr. Héctor Maldonado.

LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA DE LA MEMORIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis para optar al título de  
Doctor en Ciencias Biológicas

1999

3271

“Cabe decir con toda justicia que la marcha de las ciencias naturales, ininterrumpida e irresistible desde Galileo, se detiene por primera vez en el segmento superior del cerebro o, dicho de manera más general, ante el órgano de las relaciones más complejas del animal con el mundo exterior. Esta detención no es debida al azar; las ciencias naturales se encuentran verdaderamente en una situación crítica, ya que el cerebro, cuya formación superior es el cerebro humano, que creó y sigue creando las ciencias naturales, ha pasado a ser objeto de investigación de esas ciencias”.

Iván Plávov, apertura de su conferencia “Las ciencias naturales y el cerebro”, XII Congreso de Naturalistas y Médicos, Moscú, 1909.

### **Agradecimientos:**

A mi hija Valentina, que me enseña otra manera del ver el mundo.

A Virginia, por su amor.

A mis padres, por su apoyo incondicional y, quienes sin proponérselo, me inculcaron la vocación por la investigación.

A mi Director de Tesis, Héctor Maldonado, con quien aprendí que es imposible hacer investigación sin tener, ante todo, buenas preguntas y, por su constante paciencia, dedicación y apoyo a mi formación profesional.

A Juan Aggio, un amigo.

A mis compañeros de trabajo: Daniel Tomsic, Arturo Romano, Fernando Locatelli, Beatriz Dimant, Gabriela Hermitte, Angel Vidal , Martín Berón de Astrada, Ramiro Freudenthal, Lia Frenkel , Carla Torres, Miriam Saraco, Patricia Pereyra, Julieta Troncoso, Emiliano Merlo y Azucena Alvarez, por ser capaces de generar el mejor ambiente que he conocido para trabajar en investigación. Además, muchos de ellos han colaborado de manera efectiva en varios de los experimentos de esta Tesis.

A Carlos Pirola , Victor E. Nahmod, Gustavo Somoza y Dante Paz, por su permanente apoyo profesional.

A mis amigos, por su apoyo constante.

**A Dante.**

Muchos de los resultados mostrados en esta Tesis han sido parcial o totalmente publicados en los siguientes artículos:

Acute administration of angiotensin II improves long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. Delorenzi A, Pedreira ME, Romano A, Pirola CJ, Nahmod VE, Maldonado H. *Neurosci Lett*, 196(3):193-6, 1995.

Angiotensin II enhances long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. Delorenzi A, Pedreira ME, Romano A, Garcia SI, Pirola CJ, Nahmod VE, Maldonado H. *Brain Res Bull*, 41(4):211-20, 1996.

Angiotensin II (3-8) induces long-term memory improvement in the crab *Chasmagnathus*. Delorenzi A, Locatelli F, Romano A, Nahmod V, Maldonado H. *Neurosci Lett*, 226(3):143-6, 1997.

Memory enhancement by the angiotensinergic system in the crab *Chasmagnathus* is mediated by endogenous angiotensin II. Delorenzi A, Maldonado H. *Neurosci Lett*, 266(1):1-4, 1999.

## **Índice**

### **Capítulo 1**

<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Planteo e Hipótesis	2
1.2 Objetivos	5
1.3 Nociones y antecedentes relacionados con la hipótesis básica de esta Tesis	5
1.3.1 Neuropéptidos	5
1.3.2 Neuropéptidos en invertebrados	6
1.3.3 Persistencia estructural de los neuropéptidos a lo largo de la evolución	8
1.4 Aprendizaje, consolidación y modulación de la memoria	9
1.4.1 Aprendizaje y memoria	9
1.4.2 Consolidación de la memoria	10
1.4.3 Modulación de la memoria	13
1.4.4 Neuropéptidos involucrados en procesos de memoria	14
1.4.5 El modelo de memoria usado en esta tesis	15
1.5 Sistema Nervioso Central y Endocrino en Decápodos	18
1.5.1 Plan básico del sistema nervioso central en decápodos	18
1.5.2 Organización del SNC de decápodos	18
1.5.3 El sistema sanguíneo intraganglionar	22
1.6 El plan básico del sistema endocrino en decápodos	22
1.7 Neuropéptidos en crustáceos	23
1.8 Neurohormonas y osmorregulación en cangrejos	25
1.9 El sistema de las angiotensinas	26
1.9.1 Historia del sistema renina-angiotensina	26

1.9.2 Cascada de eventos	26
1.9.3 Acciones clásicas del sistema renina-angiotensina	28
1.9.4 Receptores de angiotensinas	30
1.9.5 Regulación de funciones celulares	31
1.9.6 Sistema Renina Angiotensina Central	32
1.9.7 El sistema Renina-Angiotensina en invertebrados	38
1.9.8 Influencia de las angiotensinas sobre procesos de memoria	41
 <b>Capítulo 2</b>	
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>46</b>
 2.1 Rasgos generales del modelo	 47
2.1.1 Características de Chasmagnathus	47
2.1.2 Lugar de Captura	47
2.1.3 Cuarto de mantenimiento en el laboratorio	47
2.1.4 Equipo	48
2.1.5 Descripción del ensayo durante los entrenamientos espaciados	49
2.1.6 Descripción de la respuesta de escape	50
2.2 Experimentos comportamentales	
2.2.1 Test de selección	50
2.2.2 Protocolo experimental	50
2.2.3 Entrenamiento fuerte y débil. Inyecciones	51
2.2.4 Evaluación de la retención de la señal	52
2.2.5 Definiciones	54
2.3 Análisis bioquímicos e inmunohistoquímicos	55
2.3.1 Radioinmunoensayo	55
2.3.2 Medición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina	56
2.3.3 Inmunohistoquímica	57

### **Capítulo 3**

#### **Resultados**

Evidencias bioquímicas de la presencia del sistema de las angiotensinas en el SNC de *Chasmagnathus*.

3.1 Inmunorreactividad similar a angiotensina II y actividad similar a enzima convertidora de Angiotensina	59
3.2 Distribución de inmunorreactividad similar a angiotensina II en el sistema nervioso central de <i>Chasmagnathus</i>	60

### **Capítulo 4**

#### **Resultados**

Farmacología de las angiotensinas sobre la Memoria Contexto Señal en *Chasmagnathus*

4.1 En busca de un efecto facilitador sobre la memoria: una curva dosis-respuesta con ANGII inyectada luego de un protocolo de entrenamiento débil de 10 ensayos	63
4.2 ANG II facilita la retención cuando es inyectada luego del entrenamiento débil de 10 ensayos, pero no luego de 5 ensayos.	66
4.3 ANG II facilita la MCS cuando es inyectada inmediatamente luego del entrenamiento débil, pero no cuando es administrada antes o una hora después del entrenamiento	67
4.4 El efecto facilitador de ANG II sobre la MCS es abolido cuando es co-administrada con Saralasin	69
4.5 El antagonista de ANGII, SAR, produce un efecto amnésico cuando es inyectado inmediatamente antes o después del entrenamiento, pero no una hora después del mismo	71
4.6 En busca de sub-tipo de receptor responsable del efecto facilitador de ANG II	76
4.7 ANG IV, un fragmento activo de la ANG II es suficiente para mostrar el efecto facilitador	80



4.8 La facilitación de la Memoria Contexto Señal por el sistema angiotensinérgico en <i>Chasmagnathus</i> está mediada por ANG II endógena	85
4.9 El antagonista de ANG II, SAR, revela un efecto amnésico en un protocolo de entrenamiento masivo	90
4.10 Conclusiones del Capítulo 4	92

## **Capítulo 5**

### **Resultados**

Papel funcional del efecto de las angiotensinas sobre la memoria en *Chasmagnathus*: En busca de un disparador endógeno del efecto mnésico de las angiotensinas

5.1 Hipótesis	96
5.2 Exposición a distintas salinidades	97
5.3 La exposición a la alta salinidad aumenta el nivel de las angiotensinas del cerebro	97
5.4 La exposición a la alta salinidad facilita la memoria en <i>Chasmagnathus</i>	99
5.5 El nivel de las angiotensinas del cerebro aumenta con la duración de la exposición a alta salinidad.	104
5.6 La facilitación de la MCS depende de la duración de la exposición a alta salinidad y no es atribuible a estrés osmótico	105
5.7 La facilitación de la MCS tampoco puede ser explicada por mayor saliencia contextual	107
5.8 Conclusiones del Capítulo 5	109

## **Capítulo 6**

Discusión general y conclusiones

6.1 Presencia de neuropéptidos similares a ANGII en el SNC de <i>Chasmagnathus</i> e inferencias acerca de sus funciones	112
6.1.1 Presencia	
6.1.2 Inferencias sobre funciones	113
6.2 Acciones mnésicas de angiotensinas en <i>Chasmagnathus</i>	115

6.3.- Papel funcional del efecto de las angiotensinas sobre la memoria en Chasmagnathus: un disparador endógeno del efecto mnésico de las angiotensinas	118
6.4 Antigüedad de los neuropéptidos y antigüedad de sus funciones	120
<b>Bibliografía</b>	121

## **Capítulo 1**

# **Introducción**

### 1.1 Planteo e Hipótesis

El planteo inicial de la presente tesis resulta de la confluencia de dos temas de investigación.

Un primer tema es el de la supuesta función de las angiotensinas en procesos mnésicos (Wright, 1994) y su relación con las otras variadas funciones que se atribuyen a estos péptidos. En efecto, las angiotensinas parecen estar involucradas en gran diversidad de procesos, desde los relacionados con cambios en la presión arterial y aumentos en la ingesta de agua y sal (hormona principal de la hipovolemia), a los que hacen a funciones reproductivas, inmunológicas, de desarrollo, diferenciación y modelado celular, así como la ya mencionada función en procesos de memoria (Wright, 1992).

Un segundo tema de investigación se refiere a la antigüedad del sistema angiotensinérgico, es decir, a la emergencia de neuropéptidos similares a angiotensinas desde etapas muy tempranas del proceso evolutivo. Es necesario señalar que varios resultados previos sugieren que las angiotensinas se encuentran muy conservadas, como lo demuestra el hecho que la secuencia de estos neuropéptidos en sanguijuelas es exactamente igual a la de los humanos (Laurent, 1995). Su existencia ha sido informada en moluscos (Gonzales, 1995) y poliquetos, y ya desde antes de esta tesis, se había demostrado la presencia de la enzima convertidora de angiotensina en el cangrejo azul, *Callinectes sapidus* (Smiley, 1994).

La confluencia de estas dos temáticas encontró un modelo muy apropiado para su estudio en el robusto paradigma mnésico del cangrejo *Chasmagnathus granulata*, intensamente investigado desde el punto de vista comportamental y mecanístico en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, de la Facultad de Cs. Exactas y Naturales (UBA). Además de las ventajas de trabajar con un modelo muy estudiado, cabe destacar que el cangrejo *Chasmagnathus* ofrece una cualidad muy interesante para los objetivos de la presente tesis, pues se trata de un animal eurihalino que vive la mayor parte de su vida en aguas salobres pero que puede soportar increíbles diferencias de salinidad en el medio, desde agua casi sin sal hasta

concentraciones un 50 % superiores al agua de mar. Es decir, *Chasmagnathus* es un animal con gran capacidad de osmorregulación, lo que adquiere especial relevancia ya que una de las funciones generalmente aceptadas de las angiotensinas está relacionada con su papel en la regulación del equilibrio de sales.

La presente investigación constituye el primer ejemplo de un estudio en un invertebrado acerca de la acción de un neuropéptido sobre la memoria a largo término, aunque el interés de la investigación propuesta no se agota en la demostración de una relación angiotensina-memoria. De acreditarse esa relación, el interés fundamental del estudio se orientaría (como corresponde a un estudio biológico) a entender cómo la supuesta función mnésica de este neuropéptido es parte de una respuesta adaptativa integral. En efecto, puede concebirse dos maneras de encarar la variada funcionalidad de las angiotensinas: Una de ellas sería la adoptada por algunos autores ante la diversidad de acciones de los opioides, y suponer así que una estrategia conservadora del proceso evolutivo ha llevado a emplear un mismo componente en funciones diversas en distintos lugares del mismo sistema nervioso, o en términos de Nichols, “el mismo transmisor es frecuentemente usado una y otra vez en diferentes áreas del sistema nervioso y en circuitos neuronales que median una amplia gama de acciones fisiológicas” (Nichols, pág. 330, 1994). Otra posible forma de entender la diversidad funcional de este neuropéptido, es concebir a las angiotensinas como señales químicas organizadoras que aseguran una rutina comportamental bajo determinadas situaciones. Esta idea es ilustrada por un esquema interpretativo propuesto por Wright (Wright, 1992) acerca de la acción de la angiotensinas en un mamífero que enfrenta una reducción en la provisión de agua. Wright propone una sucesión de hechos desencadenados por una disminución del agua disponible que provoca hipovolemia, la que conlleva a su vez a un aumento de los niveles de angiotensinas en la sangre. Esta elevación en el nivel del péptido es detectada en el sistema nervioso central, produciendo incremento en la actividad de las vías del cerebro involucradas en los estados motivacionales relacionados con sed y apetito por sodio; supresión de comportamientos no relacionados con dicho cambio como copulación y búsqueda de parejas; analgesia; aumento de presión

sanguínea y cambios hormonales dirigidos a conservar el agua corporal; incremento de comportamientos exploratorios relacionados con sed, al tiempo que aumenta la capacidad de consolidación en memorias relevantes; todo lo cual viene a elevar la capacidad de buscar con éxito nuevas fuentes de agua. Una vez que la fuente de agua es localizada este sistema regresa a su nivel basal.

Este esquema de Wright está de acuerdo con la idea de una señal química actuando como organizador u *orquestador*, propuesta en términos diferentes por varios autores para diversos neurotransmisores o neuromoduladores (Sombati, 1984; Bicker, 1989; Fitzsimonis, 1997) y que tentativamente definimos en los siguientes términos. *Orquestador es una señal química que en respuesta a un cambio en el medio externo, provoca acciones coordinadas que llevan al animal a una rutina comportamental coherente de valor adaptativo en situaciones específicas.* La demostración de que una señal química está actuando de esta manera, requiere probar la existencia de un cambio en el entorno externo, desencadenando una secuencia de eventos fisiológicos que culmina en un comportamiento apto para enfrentar la situación creada por el cambio en el medio. No hay trabajos experimentales con esta demostración para la mayoría de los neuromoduladores, angiotensinas incluidas, pese a la existencia de esquemas interpretativos minuciosos como el presentado por Wright.

Las hipótesis básicas de trabajo de esta Tesis pueden plantearse como una serie de preguntas:

¿Tiene el sistema de las angiotensinas alguna función mnésica en *Chasmagnathus*? En caso afirmativo, ¿esa función mnésica es parte de una respuesta adaptativa integral a un cambio en el entorno externo? ¿Puede concebirse que no sólo la emergencia del sistema de las angiotensinas sino también el de sus funciones más características hayan surgido tempranamente en el proceso evolutivo? Esta postulación contrasta con la que sostiene que la utilización repetida y en diversas funciones de un mismo componente (e.g. los neuropéptidos), resulta de una estrategia conservadora de la evolución por la que no hay compromiso evolutivo entre componente y función.

## 1.2 Objetivos

Planteadas estas preguntas, el primer paso del proyecto será indagar acerca de la existencia de algunos de los componentes del sistema de las angiotensinas en *Chasmagnathus*, tratando de precisar su ubicación, principalmente en el sistema nervioso central (SNC). Se intentará luego la búsqueda farmacológica, usando agonistas y antagonistas, de los posibles efectos de estos neuropéptidos sobre la memoria de largo término. Se tratará, por último, el desafío más importante, correlacionar algún cambio ambiental con las supuestas acciones mnésicas y osmorreguladoras de las angiotensinas.

## 1.3 Nociones y antecedentes relacionados con la hipótesis básica de esta Tesis.

Dedicaremos el resto de la Introducción al repaso de algunas nociones y antecedentes relacionados con las hipótesis básicas de esta Tesis, que además serán útiles para el análisis y discusión de los Resultados.

### 1.3.1 Neuropéptidos

Los neuropéptidos son sustancias endógenas presentes en las células nerviosas como y actúan transmisores y moduladores en el sistema nervioso central (De Wied, 1987). Se hallan tanto en vertebrados e invertebrados y, de hecho, aparecen funcionando como señales aún antes del advenimiento de los animales pluricelulares (Shaw, 1996). Inicialmente, muchos neuropéptidos fueron estudiados solo como hormonas, pero ya en los años 70 se comenzaron a describir muchos de ellos en el cerebro, donde la primera familia caracterizada fue la encefalina (Hughes, 1975). Señalamos a continuación propiedades particulares de los neuropéptidos (Hokfelt, 1991).

a) Pueden ser liberados de las terminales nerviosas como cotransmisores junto a un neurotransmisor clásico primario durante una estimulación neuronal de alta frecuencia [ej. GABA y neuropéptido Y,

(Kupfermann, 1991)] y, en muchos casos, su liberación es regulada de manera independiente (Hokfelt, 1994).

b) La liberación neuronal no es exclusivamente axónica, sino que puede ocurrir también desde las dendritas y el soma de estas células (Pow, 1989).

c) Los neuropéptidos tienen entre 3 y 80 residuos de aminoácidos y derivan de precursores sintetizados en el soma constituidos por 200 a 300 aminoácidos. Los precursores son clivados en sitios específicos antes que el péptido esté listo para su liberación y pueden dar lugar a más de un neuropéptido. De ahí entonces que sean transportados a una gran distancia para alcanzar la terminal sináptica. Dado que de un precursor resultan generalmente dos o más péptidos activos, ellos pueden ser liberados de manera diferencial de acuerdo a posibles procesamiento diferenciales del precursor (Blundell, 1980; van Kesteren, 1996; Sossin, 1990; Sossin, 1991).

d) Mientras que las moléculas neurotransmisoras pequeñas actúan y pueden ser removidas rápidamente de las hendiduras sinápticas, los neuropéptidos producen acciones de largo término, debido a una compleja interacción con varios segundos mensajeros y, además, son liberados en concentraciones menores que los primeros, desconociéndose mecanismos de recaptación. Así solamente una pequeña concentración del péptido alcanza los receptores, sinápticos o no, que son de una relativa alta afinidad cuando se comparan con los de neurotransmisores clásicos (Kupferman, 1991).

### **1.3.2 Neuropéptidos en invertebrados**

Un sorprendente número de neuropéptidos ha sido descrito en diversas especies de invertebrados, incluyendo animales con sistema nervioso muy primitivo como el de los colenterados. Los neuropéptidos muestran gran ubicuidad en todos los metazoos que poseen sistema nervioso (Blomm, 1984). Se hallan en células neurosecretorias, interneuronas, motoneuronas y células endocrinas (e.g. intestino) o glandulares de origen no



nervioso. Cada neuropéptido se encuentra distribuido formando un patrón típico y específico de neuronas y células neurosecretorias. En los últimos años se ha tratado de establecer cuales son las implicancias funcionales de la gran diversidad de estructura y multiplicidad de acciones de los neuropéptidos de invertebrados, ya sea en el control de funciones fisiológicas como en la generación de comportamientos específicos. Además, se ha especulado que la multiplicidad de neuropéptidos encontrados en invertebrados provee un amplio margen de comunicación a un sistema nervioso simple, incrementando así su capacidad de procesar información (Blomm, 1984).

En cnidaria, muchos péptidos con actividad morfogénica y reactivos a sueros anti-RFamida, fueron aislados del sistema nervioso y ya han sido clonados. Entre ellos destacaremos el péptido activador anterior de *Hidra* y más de 36 copias de un gen precursor de RF-amidas, que son parte de una gran familia de péptidos relacionados con FMRF-amida (FaRPs) (Grimmelikuijzen, 1992).

En nematodos (*Caenorhabditis elegans* y *Ascaris*), más de 11 FaRPs se han identificado bioquímicamente y genéticamente. Un gran número de péptidos se han hallado en anélidos, muchos de ellos pertenecientes a familias con representantes en vertebrados, moluscos e insectos, e.g. FaRPs, vasopresina/conopresina, encefalinas y miomodulinas (Brownlee, 1999).

En moluscos se han descrito, secuenciado y/o clonados más de 80 neuropéptidos, en particular en *Lymnaea stagnalis* y *Aplysia*. Muchos de estos parecen exclusivos del phylum, mientras que otros, como por ejemplo FaRPs, neuropéptido Y, bradiquinina, insulina, encefalinas y vasopresina/oxitocina (Rajpara, 1992; Wickham, 1991), están presentes a lo largo de toda la evolución animal.

La presencia e identificación de neuropéptidos en artrópodos ha sido ampliamente estudiada. La lista de péptidos aislados en insectos es sumamente importante, más de 300 (Nässel, 1993 y 1994), pero muchas de sus funciones fisiológicas y comportamentales permanecen desconocidas.

Más adelante, en esta Introducción, se presentarán algunos de los neuropéptidos descritos en crustáceos.

### **1.3.3 Persistencia estructural de los neuropéptidos a lo largo de la evolución**

Algunos neuropéptidos de invertebrados muestran grandes similitudes estructurales con péptidos de vertebrados; como por ejemplo, la secuencia del péptido activador de cabeza de *Hidra*, que es idéntica a la descrita en hipotálamo de humanos y bovinos (Schaller; 1996).

Los péptidos opioides endógenos están presentes, con secuencias idénticas, en diferentes phyla de invertebrados y vertebrados. En efecto, las mismas secuencias de Met- y Leu-encefalinas se han identificado en sanguijuelas, cangrejos y mamíferos. Sus acciones fisiológicas, tanto como neurohormonas o como neurotransmisores, están demostradas en una amplia gama de invertebrados actuando, por ejemplo, en la iniciación de respuestas comportamentales, termoregulación, cambios en cromatóforos, o la liberación de hormona hiperglucemiante de crustáceos, etc. (revisado en Nagabhushanam, 1995).

Otro ejemplo son las grandes similitudes estructurales y funcionales de los péptidos relacionados con insulina y sus receptores. Esta superfamilia, representada por insulinas y factor de crecimiento semejante a insulina se ha descrito en esponjas, moluscos e insectos (e.g. *Bombixina*). Asimismo, receptores a insulina se han identificado en *Aplysia*, *Lymnea* y *Drosophila* y cangrejos (Smit, 1988; Kucharski, 1997).

Un excelente ejemplo de conservación de un sistema de neuropéptidos es la superfamilia vasopresina/oxitocina. En mamíferos, las acciones 'clásicas' atribuidas a vasopresina, dentro de otras, son la regulación del balance osmótico y la presión arterial, mientras que para la oxitocina son las acciones en contracciones uterinas y lactación. Muchos miembros de esta familia han sido aislados a partir de tejidos provenientes de invertebrados, e.g. conopresina en moluscos, anetocina en anélidos, péptido similar a la vasopresina en langosta (Van Kesteren, 1996). En el molusco *Lymnea*, las acciones de la conopresina sugieren que este péptido posee un papel funcional ligado a la oxitocina donde, además, se han descrito dos tipos de receptores para esta familia. Una de las más importantes evidencias es la preservación del puente disulfuro formado por dos cisteínas que posee

esta familia a lo largo de la evolución (Mark, 1999). Así como los efectores de esta familia están conservados, también parecen estarlo sus receptores, constituyendo un excelente ejemplo de co-evolución de neuropéptidos y receptores (Mark, 1999).

Al igual que en vertebrados, la acción de los neuropéptidos en invertebrados está generalmente mediada por receptores específicos asociados a membrana; pudiendo ser receptores con actividad tirosina-kinasa, receptores tipo proteínas G y canales iónicos activados directamente por péptidos. En *Drosophila* y *Aplysia*, el receptor de insulina es una tirosina-kinasa que activa la MAP kinasa y afecta la excitabilidad neuronal alterando la conductancia de canales de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{K}^{+}$ . La gran mayoría de los neuropéptidos, tanto en invertebrados como en vertebrados, ejercen sus acciones a través receptores que se unen a proteínas de tipo G, provocando cambios en los niveles de segundos mensajeros como AMPc, GMPc, diacilglicerol, inositolfosfato o concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  intracelulares, o alterando directamente la conductancia de canales, modificando el metabolismo celular lo que incluye cambios a largo término como alteraciones en la expresión génica (Nässel, 1996).

Recientemente, se ha descrito y clonado en *Helix*, un canal de  $\text{Na}^{+}$  amilorida-sensible que es activado por FMRF-amida, constituyendo la primera evidencia que un neuropéptido puede actuar como neurotransmisor rápido (Cottrell, 1997).

## **1.4 Aprendizaje, consolidación y modulación de la memoria**

### **1.4.1 Aprendizaje y memoria**

Se puede considerar al aprendizaje como el proceso de adquirir información, almacenable y recuperable, sobre la base de la cual se produce un cambio en el comportamiento. La memoria, a su vez, se ha definido como la persistencia de lo aprendido en un estado que puede ser evocado en un tiempo posterior (Thorpe, 1963).

La siguiente definición operacional tiene la ventaja de aplicarse a

cualquier fenómeno de aprendizaje (Rescorla, 1976; Rescorla, 1988): una experiencia en un tiempo, T1, causa un cambio en el estado del animal (aprendizaje o, equivalentemente, memoria) que es reflejado en un *test* diferido en el tiempo, T2, en el cual el animal que ha tenido esta experiencia se comporta distinto de aquél que no la ha tenido.

Básicamente existen dos tipos de aprendizaje: *asociativo* y *no asociativo*. Aprendizaje *no asociativo* es el que ocurre en relación a un solo estímulo y puede ser considerado como la modificación en un solo canal de información. Dos de las formas mas comúnmente estudiadas del aprendizaje *no asociativo* son: a) la *habitación*, definida como la caída de una respuesta a un estímulo como resultado de su presentación repetida, y b) la *sensibilización*, definida como el aumento de la respuesta a un estímulo como resultado de la presentación repetida de una señal intensa o nociva. En los paradigmas de *aprendizaje asociativo* los arreglos experimentales incluyen una contingencia entre eventos, que pueden ser tanto sólo entre estímulos externos como entre estímulos y acciones propias del sujeto experimental; representando formas de aprendizaje que involucran la convergencia de distintos tipos de canales de información.

La idea que cambios persistentes en la eficacia de las transferencias de señales, o sea de la eficiencia sináptica, estén involucrados en mecanismos neuronales de aprendizaje y memoria ha sido expuesta ya por Ramón y Cajal y, en esta misma línea de argumentación, Hebb la expuso como el concepto de “ensamble celular” (Spatz, 1996). Esta hipótesis tiene hoy fuerte apoyo experimental (Kandel, 1982; Bliss, 1993; Elgersma, 1999; Izquierdo, 1997). Así, la existencia de estructuras neuronales cuya conectividad se ve alterada durante el proceso de aprendizaje produciendo nuevas vías que representan el *trazo mnésico*, es postulada como la base del almacenamiento de la información (Squire, 1993; Squire, 1987; Solomon, 1986; Kandel, 1997; Alkon, 1984).

#### **1.4.2 Consolidación de la memoria**

Se distinguen diferentes fases de memoria, tanto en el caso de

vertebrados como de invertebrados. Se suele postular así, la existencia de una *memoria de corto término*, una *memoria intermedia* y otra de *largo término* (Goelet, 1986; Bernabeu, 1997; Izquierdo, 1998; Hammer, 1995; Yin, 1996). La memoria de corto término se refiere a los sistemas que retienen la información sólo temporalmente, pudiendo ser luego transferida a una forma intermedia u a otras mucho más estable en el tiempo (Squire, 1987; Sedman, 1991; Izquierdo, 1998; Hammer, 1995; Benabbeu, 1997).

De manera teórica, se ha distinguido entre sistemas neuronales intrínsecos y extrínsecos en procesos de memoria. El *sistema intrínseco* se refiere a las representaciones fisicoquímicas en estructuras neuroanatómicas donde la información es almacenada (*trazos mnésicos*). El *sistema extrínseco* se refiere a las vías que influyen la construcción de los trazos mnésicos mediante la liberación de neurotransmisores, neuromoduladores, y otros neuromensajeros. Dicho de otra forma, el almacenado de la memoria es regulado por áreas del cerebro que no son los sitios donde se construye (Mishkin, 1982). Este tipo de sistemas neuronales parece ser una propiedad tanto de vertebrados (Squire, 1989) como de invertebrados (Krasne, 1979). La existencia de sistemas endógenos que modulan la memoria, distintos de los substratos neuronales que le sirven de base, se ha hipotetizado desde hace más de 20 años. Krasne (Krasne, 1979) planteó que, a lo largo de la evolución, el sistema nervioso presenta mecanismos y circuitos que controlan el desarrollo, expresión y mantenimiento de los procesos de memoria.

La adquisición es sólo la etapa inicial de los procesos de memoria. Estos procesos incluyen además, *consolidación* y *evocación* de la información adquirida. *Consolidación* es generalmente considerado como el período crítico en el cual el *sistema extrínseco* es capaz de influir a la construcción de la memoria. En otros términos, la consolidación está definida por el pasaje de memoria de corto término a memoria de largo término. El proceso de *evocación* de la memoria hace referencia a la reinstalación de un patrón previo de activación usando parte de este patrón como señal (de Wied, 1997).

Los efectos facilitadores o inhibidores de distintos tipos de agentes, como choques eléctricos o administración de drogas, se suelen explicar por

su intervención durante la consolidación (Gold, 1976; McGaugh, 1973). La efectividad de estas intervenciones es tiempo-dependiente, ya que su poder cae a medida que aumenta el tiempo entre la finalización del entrenamiento y el tratamiento (McGaugh, 1973). Estas características de los procesos de memoria se encuentran a lo largo de toda la escala evolutiva animal, apoyando la hipótesis de que el proceso de consolidación está evolutivamente conservado (Bank, 1988; Pelz, 1997; Menzel, 1997).

#### **1.4.3 Modulación de la memoria**

La retención de la memoria puede ser modificada (en más o en menos) por diversos factores endógenos durante las fases de adquisición y consolidación, como consecuencia de los estados internos del animal e.g. estados de alerta, período reproductivo (Mc Gaugh, 1983). Kety (Ketty, 1972) propuso que las influencias neuroendócrinas que suceden durante eventos "importantes" constituyen la señal que el SNC genera para que estos eventos sean recordados.

Si bien la mayoría de los estudios acerca de los mecanismos de memoria centran su atención sobre los eventos neuronales que median la memoria y la localización del trazo mnésico, los estudios sobre la modulación apuntan a comprender los sistemas endógenos que influyen en estos mecanismos. Así plantearon este tópico Gold y McGaugh (Gold, 1977): " Si las consecuencias fisiológicas de una experiencia son considerables, esta experiencia debe ser retenida más eficientemente y por períodos más prolongados. Si las consecuencias son triviales, la experiencia es olvidada rápidamente. De este modo, procesos mnésicos tiempo-dependientes pueden ser el resultado del desarrollo de un mecanismo mediante el cual el organismo sea capaz de seleccionar cuales de las diferentes experiencias recientes deben ser almacenadas de manera permanente"

Según McGaugh, la modulación de un proceso mnésico puede inactivarse sin que esto signifique la pérdida de las memorias almacenadas. Se observó además que, mientras los mecanismos para el almacenamiento de la memoria son específicos para cada tipo de aprendizaje, los sistemas de

modulación pueden alterar diferentes formas de memoria (Cahill, 1996).

La modulación del almacenamiento de la memoria ha sido estudiada principalmente en vertebrados. Diferentes neurotransmisores, como aminos, aminoácidos excitatorios o inhibitorios, y numerosos neuropéptidos, tanto como hormonas corticoides (Squire, 1987), intervienen en procesos límbicos modulando diferentes fenómenos de tipo cognitivos, entre ellos los procesos de aprendizaje y memoria.

Las hormonas más estudiadas como moduladores endógenos en procesos mnésicos son aquellas que intervienen y se liberan bajo situaciones de estrés (De Wied, 1989). Dos factores son críticos en los efectos que tienen los estados emotivos sobre la memoria en mamíferos: el sistema catecolaminérgico, periférico o central, y el complejo amigdalóide (Cahill, 1998). Los efectos moduladores sobre la memoria, de parte de la adrenalina, glucosa, corticoides, los sistemas colinérgicos y noradrenérgicos, entre otras sustancias, han sido bien documentados (revisado en Iversen, 1988).

#### **1.4.4 Neuropéptidos involucrados en procesos de memoria**

Durante los últimos veinte años, un gran número de neuropéptidos, y sus receptores específicos, han sido descritos en el SNC, abriendo la pregunta acerca de cuáles son sus significados funcionales. En los primeros trabajos hechos con hormonas hipotalámicas, se concluyó que estos transmisores cerebrales juegan un importante papel en la plasticidad neuronal y, por lo tanto, en procesos de aprendizaje y memoria (de Wied, 1989). De ahí entonces que las hormonas hipotalámicas y las melanocortinas (ACTH/MSH) hayan sido estudiadas más extensivamente que otros péptidos en procesos de memoria.

La vasopresina, cuyas funciones 'clásicas' son la regulación de la diuresis y el control de balance de fluidos corporales, es conocida como facilitadora de la memoria en varias de las formas activas de esta superfamilia de neuropéptidos (de Wied, 1997; Feiman, 1987). La liberación endógena provocada por situaciones de estrés, o la inyección de una solución hipertónica (central o periférica), tienen efecto facilitador sobre la

memoria que puede ser prevenido por el uso de antagonistas específicos (Landergraft, 1998; Baratti, 1989). Al igual que muchos otros neuropéptidos, la vasopresina también está involucrada en el fenómeno de LTP, además de ser un excelente ejemplo de modulador endógeno, habiéndose demostrado que cumple todos los criterios para ser designado como "mejorador endógeno" de procesos cognitivos según de Wied (de Wied, 1997). Estos criterios son: a) los efectos post-entrenamiento son tiempo dependientes; b) se demuestra la presencia y liberación del péptido en estructuras cerebrales, en particular aquellas relacionadas con procesos de memoria; c) los tratamientos intracraneales resultan más efectivos que los periféricos y; d) el bloqueo del sistema peptidérgico produce alteraciones en la memoria.

Por otro lado, un miembro de esta superfamilia, la oxitocina, presenta efectos contrarios y ha sido propuesto como un péptido principalmente amnésico (Kovacs, 1994 a). Así, los integrantes de esta superfamilia de neuropéptidos son capaces de ejercer variadas acciones, ya que un mismo precursor es capaz de generar diferentes metabolitos activos (de Wied, 1987).

Las melanocortinas, ACTH/MSH, a diferencia de otros neuropéptidos, no parecen tener acciones a nivel celular de largo término pero presentan profundos efectos cognitivos que han sido interpretados en términos de atención y motivación, considerados entonces efectos de segundo orden sobre procesos mnésicos (Kovacs, 1994 a).

Las endorfinas endógenas también tienen efectos cognitivos. Izquierdo (Izquierdo, 1989) arguye, especialmente con referencia a efectos opiáceos, que las diferencias en los estados neurohormonales del animal, antes, durante o después del entrenamiento y la evaluación, afectan negativamente la recuperación de la memoria.

Uno de los neuropéptidos más estudiados en el sistema nervioso es la sustancia P, un miembro de la familia de las taquiquininas. Sus papeles en el SNC no son claros aún y, en cuanto a su acción sobre procesos de memoria, se han mostrado tanto efectos facilitatorios o inhibitorios dependiendo de los sitios de inoculación de esta sustancia (Huston, 1995).

Otros péptidos que también influyen procesos de memoria son la CRH, la hormona de crecimiento, la hormona liberadora de tirotrófina, la hormona



luteinizante, la colecistoquinina, el neuropéptido Y, el péptido vasointestinal y la angiotensina (Kovaks, 1994a).

La hipotética existencia de un sistema intrínseco de memoria y un sistema modulador extrínseco, ha llevado a pensar que los neuropéptidos pueden afectar procesos de memoria tanto actuando directamente sobre el sistema intrínseco (efectos de primer orden) o, indirectamente a través de la liberación de otro/s neuromensajero/s (efectos de segundo orden). Conforme con este distingio, suele aceptarse que la vasopresina tiene efectos tanto de primer como de segundo orden, mientras que la MSH lo hace como un efector de segundo orden (de Wied, 1997).

#### **1.4.5 El modelo de memoria usado en esta tesis**

Los trabajos acerca de procesos de memoria en el carigrejo *Chasmagnathus granulata* se iniciaron en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria de esta Facultad en el año 1984, basados en una recurrente observación de campo confirmada por pruebas muy elementales de laboratorio. *Chasmagnathus* tiene todas las facilidades de experimentación generalmente atribuidas a un sistema simple, presentando además otras ventajas, como la posibilidad de ser capturado durante todo el año y en grandes cantidades; su fácil mantenimiento en el laboratorio; la constancia de la respuesta de escape ante un peligro, base del paradigma de aprendizaje que usamos; y el hecho de carecer de una barrera hemato-cerebral endotelial, lo que permite detectar el efecto de drogas inyectadas en muy bajas dosis por vía sistémica (Maldonado, 1997).

*Chasmagnathus* despliega una respuesta característica de escape ante la presentación de un estímulo de peligro, al que se habitúa luego de unas pocas presentaciones separadas por un intervalo entre estímulos mayor a 27 segundos. La disminución de la respuesta persiste por un largo tiempo (al menos por siete días) (Pedreira, 1998) y no puede ser explicada por fatiga motora ó adaptación sensorial (Lozada, 1990). Esta memoria a largo término de *Chasmagnathus* es robusta y de adquisición rápida; exhibiendo estímulo-especificidad, frecuencia-especificidad (Pedreira, 1998) y dependencia de la fase circadiana. La constancia de la respuesta de escape así como la

posibilidad de ser fácilmente cuantificable, permitió la total automatización de la estimulación y del registro de actividad .

Inicialmente este proceso mnésico fue considerado un ejemplo más de habituación a largo término y así se lo denominó. Sin embargo, resultados posteriores demostraron: a) que se trataba de un aprendizaje asociativo mediado por la asociación del estímulo repetido con el contexto (Tomsic, 1998); b) que se adquiría siempre que se dieran 15 o más ensayos con un intervalo mayor a 27 seg. (entrenamiento espaciado, EE); c) que si el intervalo era igual o menor a 9 segundos, solo podía demostrarse retención de la memoria en una sesión de evaluación a 24 horas, si se daba un entrenamiento con más de 100 ensayos (entrenamiento masivo, EM); d) que mientras el EE producía una retención que se manifestaba tanto en el primer ensayo de la sesión de evaluación como en el re-entrenamiento que la seguía, el EM sólo producía retención en la fase de re-entrenamiento (es decir, jamás se logra retención en el primer ensayo de la evaluación cualquiera sea el número de ensayos del EM); e) que si el intervalo entre ensayos se anulaba completamente (entrenamiento continuo, EC), no se puede obtener retención en ninguna fase de la sesión de evaluación, cualquiera sea el número ensayos de entrenamiento; f) que mientras el EM provoca una reducción drástica de la respuesta de escape sin su reemplazo por otra respuesta defensiva, el EE provoca un reemplazo de la respuesta de escape por otro ítem defensivo: el congelamiento (freezing) (Pereyra, 1999). Por lo tanto, distinguimos:

**Memoria Contexto Señal (MCS):** adquirida por EE (15 o más ensayos con un intervalo entre ensayos mayor a 27 segundos).

**Memoria Señal (MS):** adquirida por EM (100 o más ensayos con intervalo menor a 9 segundos pero mayor a 4 segundos).

Con estos paradigmas se han realizado una serie de estudios comportamentales y mecanísticos que nos han permitido determinar para cada uno, las siguientes propiedades (Berón de Astrada, 1999; Romano; 1996; Freudenthal, 1997; Hermitte, 1999; Pedreira, 1998; Tomsic, 1993 y 1998; Pereyra, 1996; Bruner, 1988):

Memoria contexto- señal (MCS)	Memoria señal (MS)
Adquisición únicamente por entrenamiento espaciado (ej. 30 ensayos separados por 81 seg.)	Adquisición únicamente por entrenamiento masivo (ej. $\geq 300$ ensayos separados por 0 seg.)
La retención de la memoria es expresada tanto en el primer ensayo de evaluación como en el re-entrenamiento	La retención de la memoria es expresada únicamente durante la fase final de la evaluación (re-entrenamiento)
Memoria asociativa entre contexto y señal (la respuesta condicionada resulta disminuida por un cambio contextual, así como por inhibición latente o extinción)	Memoria no asociativa (habitución). La respuesta habituada no es disminuida por un cambio contextual.
La retención de la memoria persiste al menos por cinco días.	La retención de la memoria no persiste por más de 48 horas.
La retención de la memoria depende de la síntesis de novo de proteínas (Es sensible a cicloheximida y actinomicina-D)	La retención de la memoria no es afectada por el bloqueo de la síntesis proteica (Es insensible a cicloheximida)
La vía de transducción de señales c-AMP dependiente está involucrada (La memoria es facilitada por activadores de PKA y disminuida por inhibidores)	La vía de transducción de señales c-AMP dependiente parece no estar involucrada (inhibidores o activadores de PKA no parecen afectar esta memoria)
Después del entrenamiento espaciado se revela un mayor nivel de actividad del factor de transcripción Rel/ $\kappa$ B-like en extractos nucleares de cerebro	Después del entrenamiento masivo no se revela una mayor actividad del factor de transcripción Rel/ $\kappa$ B
Mecanismos colinérgicos muscarínicos están involucrados en la memoria contexto-señal (La MCS es bloqueada por escopolamina y facilitada por oxitremorina)	No es afectada por escopolamina

Los opioides juegan un papel importante en la memoria de corto término, estando involucrados en la caída de la respuesta que se produce durante una sesión de entrenamiento de tipo espaciado. Por otro lado, las

inyecciones de opioides luego del entrenamiento no muestran ningún efecto sobre esta MCS (Tomsic, 1990 y 1991; Godoy, 1995).

## **1.5 Sistema Nervioso Central y Endocrino en Decápodos**

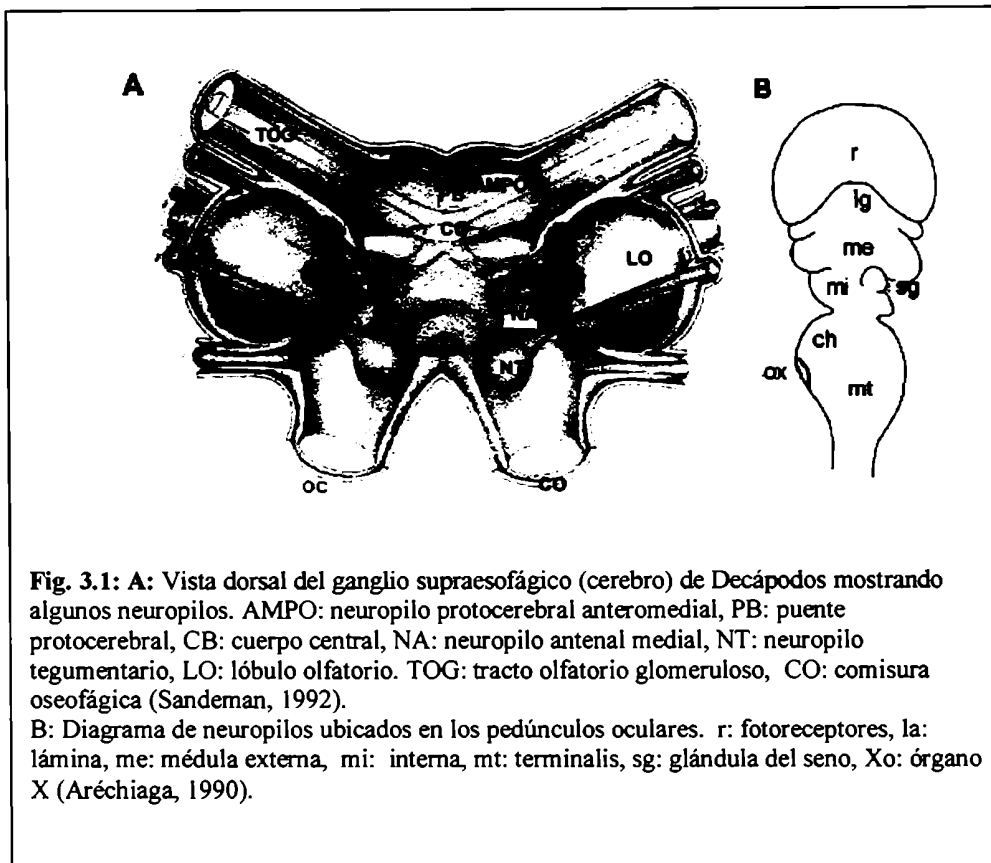
### **1.5.1 Plan básico del sistema nervioso central en decápodos**

Describiremos brevemente el plan general del sistema nervioso central de decápodos así como el esquema endocrino, incluyendo una breve reseña sobre los procesos de osmorregulación en estos animales.

Como todos los animales con simetría bilateral, los decápodos poseen el cerebro en su parte anterior.

### **1.5.2 Organización del SNC de decápodos**

El ganglio cerebral de los decápodos esta subdividido en áreas de neuropilos unidos unos con otros por tractos de axones y agrupamientos de neuronas. Algunos de estos neuropilos están ordenados geométricamente, otros forman columnas o esferas de zonas sinápticas llamados glomerulares y otros no poseen estructuras ordenadas (Sandeman, 1993). Ciertas funciones primarias de estos neuropilos pueden deducirse debido a que sus aferencias y eferencias fueron fácilmente reconocibles, mientras que en otros esto no es posible. Varios de los neuropilos descriptos están unidos por tractos o comisura de diverso tamaños. Los cuerpos celulares se hallan ubicados en grupos y la nomenclatura que usaremos es la propuesta por Sandeman (Sandeman, 1992). Los nombres de los neuropilos no guardan relación con su probable función ya que son altamente heterogéneos, con variadas proyecciones y aferencias. Dos diagramas genéricos de Decápodos se muestran en la Fig. 3.1.



Existen tres principales divisiones en el cerebro de estos animales: *protocerebro*, *deutocerebro* y *tritocerebro*:

El *protocerebro* puede ser dividido en tres partes: los *ganglios ópticos*, el *protocerebro lateral* y el *protocerebro medial*. Dentro de los pedúnculos, en cangrejos, están contenidos los dos primeros.

Los *ganglios ópticos* contienen los siguiente neuropilos: *lámina*, *médula externa* y *médula interna*. Los axones ubicados en esta región están ordenados geométricamente (Strausfeld, 1980). El patrón de mosaico de los fotorreceptores y los elementos ópticos de las omatidias de los ojos compuestos, se proyecta a través de los lóbulos ópticos en un arreglo columnar de neuronas. Esta estructura columnar puede ser rastreada en los primeros 3 neuropilos que son considerados como parte del órgano receptor visual (Strausfeld, 1980).

La *lámina* está compuesta por dos capas, bien definidas por los niveles de terminales axónicas de fotorreceptores y árboles dendríticos de otras

células. De las ocho células retinales que componen una omatidia, siete receptores 'verdes' terminan en la *lámina* y el restante (violeta) en la *médula*, indicando que el procesamiento de color se puede establecer ya a estos niveles (Wiersma, 1982; Nässel, 1987).

La organización de las fibras en la *médula* está conformada por arreglos columnares y laminares. Cuatro clases de neuronas se hallan en este neuropilo y han sido muy estudiadas por el grupo de Glantz como un modelo para el procesamiento primario de señales visuales. Dos clases llevan información directamente a áreas protocerebrales en el cerebro y son denominadas SFs (*sustainig fibers*) y DFs (*dimming fibers*). Ambas proyectan a través del nervio óptico al protocerebro. Las otras dos clases de neuronas son las células amácrinas medulares, exclusivamente locales, y las tangenciales, neuronas centrífugas que llevan señales desde la *médula externa* a la *lámina*. Se han propuesto varios modelos de integración de estas neuronas. Se ha demostrado su capacidad para usar luz polarizada como fuente de información (Glantz, 1998, a y b, 1995, 1996; Pfeiffer, 1989), hecho que había sido sugerido por observaciones histológicas varios años atrás (Strausfeld, 1980).

La *médula interna* está formada por varias capas, con neuronas locales o que inervan hacia el protocerebro medial; aquí se han identificado varias fibras sensibles a movimientos. Estas neuronas probablemente sean presinápticas a las pre-motoneuronas del tritocerebro y son parte integral del circuito subyacente a la respuesta defensiva de la langosta de río generada por estímulos visuales (Nässel, 1987).

#### El protocerebro lateral:

Los dos neuropilos restantes que se ubican en los pedúnculos oculares son la *médula terminal* y el *cuerpo hemielipsoide* (Fig. 3.1.B). Embriológicamente derivados del protocerebro medio están tanto involucrados en el procesamiento de señales visuales como en la integración de información olfativa (Bullok, 1965, Blaustein, 1988). En ninguno de ellos se encuentran elementos geoméricamente estructurados. La *médula terminal* contiene células neurosecretorias tanto del *órgano-X* como de la *glándula del*

*seno*. Ésta última glándula es un órgano neurohemal asociado al *órgano-X* que juntos, forman el más importante sistema neuroendócrino de crustáceos (Cooke, 1982). El *cuerpo hemielipsoide*, estructura análoga a los corpora pedunculata de insectos, es considerado un área de integración (Strausfeld, 1995; Gupta, 1987).

#### El protocerebro medial:

El resto del protocerebro está conformado por el protocerebro medial que se halla ubicado dentro del *ganglio supraesofágico* (SE) (Fig. 3.1.A). Los neuropilos que lo componen son los neuropilos protocerebrales anteriores mediales, los posteriores mediales (los últimos reciben aferencias, entre otras, de la *médula interna* y el *cuerpo hemielipsoide*), el *punte protocerebral* y el *cuerpo central*. Al igual que toda esta región el *cuerpo central* no posee aferencias primarias y se ha postulado, debido a su configuración, que este área también tiene funciones asociativas (Sandeman, 1992).

#### Deutrocerebro:

Todos los neuropilos que lo conforman se encuentran ubicados en el *ganglio supraesofágico*. Está conformado por: el *lóbulo olfatorio*, que contiene campos densamente empaquetados de sinapsis (glomérulos olfatorios) y recibe, entre otras, aferencias primarias de los quimiorreceptores de la antena I (Sandeman, 1993); el *neuropilo de la antena I lateral*, que recibe aferencias primarias de varios tipos receptores (no visuales); el *neuropilo de la antena I medial*; el *lóbulo accesorio*; el *neuropilo comisural deutrocerebral* y el *neuropilo del tracto olfatorio globular*.

#### Tritocerebro:

La parte del *tritocerebro* que se encuentra dentro del *ganglio supraesofágico*, está constituida por los neuropilos de la *antena II* y el *neuropilo tegumentario*, mientras que el resto se halla principalmente en el *ganglio torácico*.

### **1.5.3 El sistema sanguíneo intraganglionar**

Una gran red de sistemas capilares irriga el cerebro y los lóbulos ópticos. En *Chasmagnathus*, al igual que en otros Braquiuros, existen arterias que salen del corazón y llevan la hemolinfa directamente al SNC. Los capilares se abren descargando la hemolinfa en sinuosidades hemocélicas. Los vasos están distribuidos de tal manera que ninguna rama nerviosa en los neuropilos se encuentra a más de 20-25  $\mu\text{m}$  de los vasos sanguíneos y a menos de 200  $\mu\text{m}$  de los somas neuronales (Sandeman, 1967; Sandemaan, 1982).

En insectos y vertebrados, existe una barrera de difusión entre los vasos sanguíneos intracerebrales y las neuronas del SNC denominada barrera hematoencefálica endotelial. En crustáceos, por el contrario, no hay una barrera endotelial que impida significativamente la difusión, de tal manera que una vez que la hemolinfa es impulsada hacia los capilares del SNC, la ausencia de barrera de difusión permite un rápido intercambio entre la sangre y los componentes celulares del neuropilo (Abbot, 1970).

### **1.6 El plan básico del sistema endocrino en decápodos.**

El sistema endocrino de crustáceos consiste en glándulas endocrinas de tipo epitelial y estructuras endocrinas de naturaleza nerviosa: las células neurosecretoras y los órganos neurohemales. Una gran cantidad de hormonas en estos animales es de origen nervioso. El control hormonal de la fisiología de estas glándulas y de la liberación de las neurohormonas se encuentra fundamentalmente bajo control del sistema nervioso (Fingerman, 1987 y 1992).

El mayor centro de control neuroendócrino de los crustáceos es *la glándula del seno* (GS). Desde la GS se liberan, entre otras, hormonas peptídicas, que actúan sobre varios tejidos, como por ejemplo, otras estructuras endocrinas. En todos los grupos donde se ha detectado este sistema se han identificado neurohormonas involucradas en procesos de muda, maduración sexual, adaptación a la luz o en adaptaciones metabólicas



en respuesta a cambios ambientales. La GS no produce la neurohormonas que contiene, sólo las almacena y libera. La mayor parte de esta glándula consiste en grupos de terminales axónicas más algunas células gliales [su estructura ha sido revisada por Cooke y Sullivan (Cooke, 1983)]. Al menos el 90 % de los axones provienen de cuerpos celulares que se encuentran en la médula terminal, a cuyo conjunto se conoce como órgano X (OX). Así, el complejo *glándula del seno -órgano X*, está formado por un conglomerado de alrededor de 200 células y se encuentra ubicado en los pedúnculos de crustáceos. Algunos autores mostraron que células neurosecretoras ubicadas en el cerebro y el ganglio torácico también generan axones que termina en la GS (Jaros, 1978). Esta glándula es estructural y funcionalmente análoga al sistema hipotálamo-hipófisis de vertebrados y de los cuerpos cardíacos de insectos (Cooke, 1983). La liberación de hormonas se encuentra regulada por influencias ambientales y endógenas como los ciclos de luz, ritmos endógenos y condiciones estresantes. Además se conoce la influencia de GABA, aminas y encefalinas en la liberación de sustancias de la GS (García, 1998).

Varias células neurosecretoras se han descripto en el cerebro y ganglio torácico del cangrejo (Bressac, 1988). Otros órganos neurohemales presentes en Decápodos son el *órgano Y*, los órganos pericárdicos, los *órganos postcomisurales*, las glándulas *androgénicas* y ovarios y, los *órganos mandibulares* (Fingerman, 1997).

### 1.7 Neuropéptidos en crustáceos

La biología de los neuropéptidos en crustáceos tiene una historia interesante ya que incluye la caracterización de la primera neurohormona en invertebrados, el octapéptido hormona concentradora de cromatóforos (RPCH), sintetizada en los pedúnculos oculares y encontrada en langostas y en cangrejos (Fernulnd, 1972). Esta hormona pertenece a la superfamilia de hormonas de artrópodos conocida como RPCH-AKH (de RPCH-adipokinetic hormone).

Los avances más importantes en el terreno hormonal en crustáceos se

hicieron, quizás, con relación a las familias que pertenecen funcionalmente al sistema GS-OX, donde se hallan, por ejemplo, péptidos inusualmente grandes (de 70 a 80 aa), como por ejemplo, la hormona hiperglucemiante (Tensen, 1991), la hormona inhibidora de la muda y la hormona inhibidora de la vitelogénesis. Estos tres últimos sólo se han descrito en crustáceos (revisado en Keller, 1992).

Por otra parte, la localización e identificación de endorfinas en este sub-phylum comenzó en 1981 (Mancilla, 1981). Hoy se conoce que las encefalinas así como varios receptores de esta superfamilia se encuentran en el sistema nervioso y órganos endocrinos de estos animales. Se conoce que algunos de sus miembros modulan la actividad locomotora (Martinez, 1988), producen analgesia (Lozada, 1988), están involucrados en la habituación a corto término en *Chasmagnathus* (Tomsic, 1990) y modulan la ubicación de pigmentos retinales dentro de las omatídiás así como los niveles de glucosa circulantes (Sarajoni, 1995; Nagahushanam, 1995).

Hormonas hipotalámicas e hipofisiarias de vertebrados, tanto como neurofisinas, han sido descritas en crustáceos. Sustancias similares a la somatostatina se han descrito en los ganglios de isópodos (Martin, 1981). En neuronas y fibras de pedúnculos oculares y en la GS de diferentes decápodos, se ha descrito la presencia de sustancias similares a neurofisinas y arginina-vasopresina así como vasotocina y oxitocina, además de hormona estimulante de melanocitos. En cuanto a sus probables funciones, se sabe que la oxitocina eleva los niveles de glucosa, y que la Lys-vasopresina, la Arg-vasopresina y la vasotocina remedan las acciones de la hormona inhibidora de la muda (revisado en Fingerman, 1993).

Otros neuropéptidos que han sido encontrados en el sistema nervioso y órganos endocrinos de crustáceos, al menos por inmunorreactividad, son gastrina y colesistoquinina, insulina, sustancia P y calcitonina (Fingerman, 1993).

Se han descrito neuropéptidos de crustáceos homólogos a los de insectos, como alostotatinas (Duve, 1997), FLRFamidas (Mercier, 1993), péptido cardioactivo de crustáceos, RPCH, proctolina, hormona dispersante de pigmento, y péptidos relacionados con taquiquininas (Beltz, 1988).

### **1.8 Neurohormonas y osmorregulación en cangrejos**

Los cangrejos, al igual que otros crustáceos, han conquistado una gran variedad de hábitats, por lo que les ha sido fundamental “solucionar” problemas de osmorregulación para ocupar condiciones ambientales tan dispares. La mayoría de estos animales pueden ser clasificados en osmorreguladores y osmoconformadores; los primeros soportan ambientes tanto hipo como hiperosmóticos con respecto a su medio interno y son denominados hipo-hiperreguladores. Aquéllos que mantienen su medio interno hiperosmótico con respecto al medio externo, poseen varios mecanismos que limitan la entrada de agua y pérdida de iones (Mantel, 1983). Estas capacidades se pueden ver alteradas por varios factores, e.g. diferentes estadios de sus ciclos de vida, épocas del año, temperatura. Uno de los principales tejidos efectores involucrados en estos procesos son las branquias y, en particular, las dos branquias posteriores constituyen un órgano blanco de varias hormonas que intervienen en el balance hídrico (Péquex, 1995). Muchos cangrejos son capaces de soportar grandes diferencias de salinidad con respecto a su medio interno y, con tiempos de adaptación que parecen ser de horas a pocos días (Santos, 1999).

El estudio del control hormonal en el balance hidromineral no ha sido frecuentemente abordado en crustáceos. Varios factores sintetizados en el cerebro y ganglio torácico afectan la permeabilidad e incorporación de sodio desde las branquias (Kamemoto, 1991). Los efectos producidos por la ablación de los pedúnculos oculares indican que algún factor liberado en éstos lugares controla el influjo de sodio a la hemolinfa (Mc Namara, 1990), habiéndose demostrado, además, que inyecciones de extractos de *glándula del seno* incrementan la presión osmótica en la langosta de río (Eckhardt, 1995). Por otro lado, los órganos pericárdicos aumentan el influjo de sodio desde las branquias hacia la hemolinfa a través de la liberación de dopamina y octopamina hacia la circulación (Kamemoto, 1975). Se ha sostenido que los cambios en la frecuencia cardíaca, producidos como respuesta a un cambio en la osmolaridad externa, pueden ser parte de las adaptaciones a estas

alteraciones, inducidos quizá, por hormonas cardioexcitadoras (Hume, 1976; Mc Gaw, 1998).

## **1.9 El sistema de las angiotensinas**

### **1.9.1 Historia del sistema renina-angiotensinas**

Hace 101 años, Tiegerstedt y Bergman encontraron que extractos de riñón contenían una sustancia presora que denominaron renina. Ese descubrimiento tenía importancia en el problema de hipertensión arterial y su relación con disfunciones renales. Los grupos a cargo de Braun-Menendez y Page describieron, en los años 40, que la renina es una enzima que tiene como sustrato una proteína plasmática que forma la sustancia presora, a la que se denominó “hipertensina” por el grupo argentino y “angiotonin” por el estadounidense. Luego de muchos años se la renombró, llamándose angiotensina a la sustancia presora y angiotensinógeno al sustrato plasmático. Más tarde se comenzaron a esbozar mejor sus componentes y se describieron el precursor, angiotensina I (ANG I), y el octapéptido activo angiotensina II (ANG II). Luego, entre los años 50' y 60' se describió al sistema renina-angiotensina como un mecanismo para estimular tanto la síntesis como la secreción de aldosterona. De este modo, desde hace aproximadamente 50 años, el sistema renina-angiotensina (SRA) sistémico con uno de sus efectores, ANG II, se conoce como uno de los sistemas endócrinos más importantes en la regulación de la presión arterial y la homeostasis de fluidos corporales en mamíferos (Skeggs, 1984).

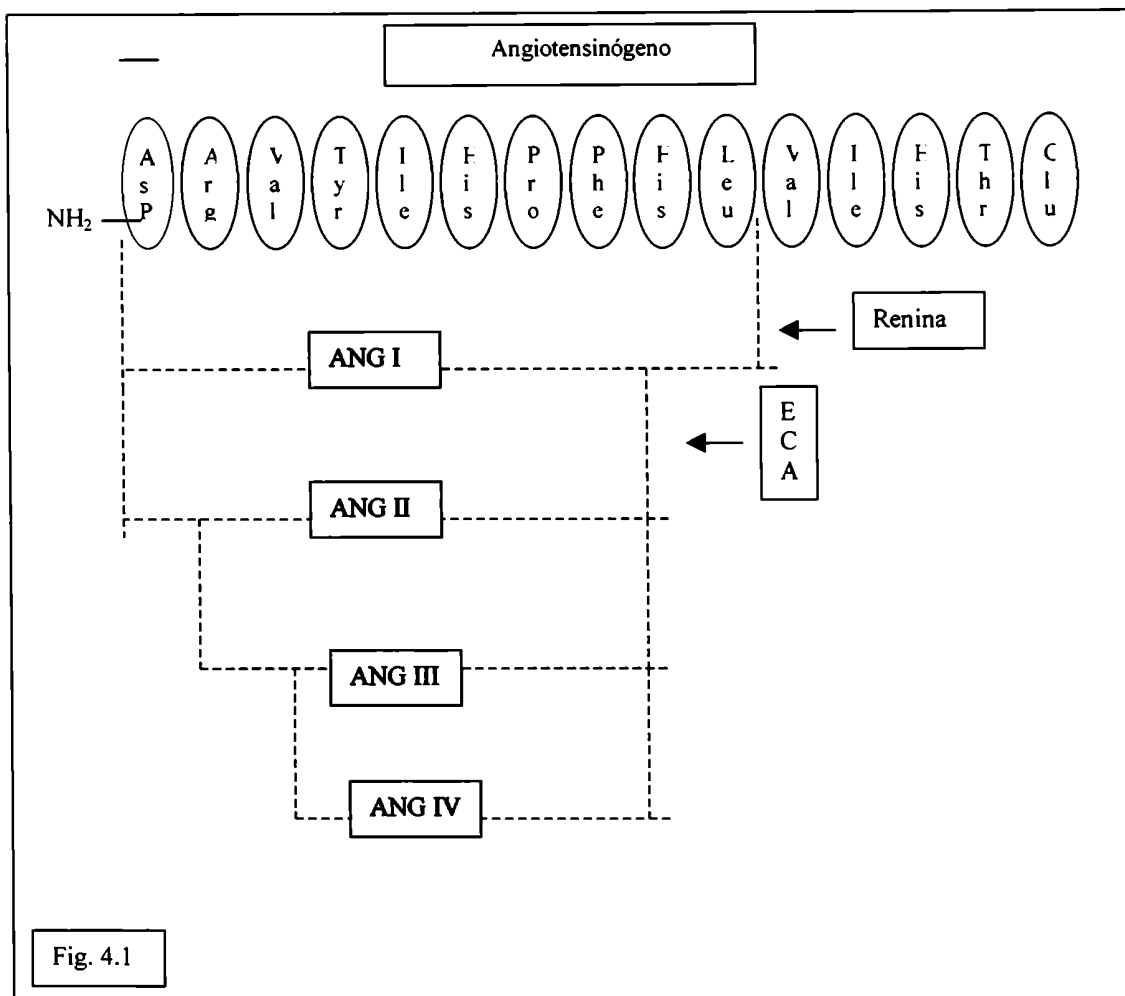
### **1.9.2 Cascada de eventos**

La cascada de eventos que generan los péptidos activos de este sistema puede describirse de la siguiente manera: una vez liberada y activada, la **aspartil-proteasa renina**, cliva al **tetradecapéptido** precursor, el

**angiotensinógeno**, originando el **decapeptido angiotensina I**, al que no se le conocen acciones biológicas. Este péptido es clivado por la **enzima convertidora de angiotensina** (ECA; E.C 3.4.15.1) generando un potente vasoconstrictor humoral, el **octapéptido ANG II**. ECA es una metalloproteínasa dependiente de Zinc que hidroliza el dipéptido His-Leu para formar ANG II (Fabris, 1990). Esta enzima, que no es específica para este sistema, cliva dipéptidos de diversos sustratos que tienen grupos carboxi terminales libres. Está presente en varios tejidos de vertebrados, con altas concentraciones en las membranas del endotelio arterial del pulmón (Lipke, 1988). Varios son los sustratos conocidos de esta enzima y entre ellos es de destacar al robusto vasodilatador periférico bradicinina que es inactivado por ECA (Linz, 1992). El angiotensinógeno es una abundante  $\alpha_2$ -globulina sérica cuya porción amino terminal es clivada y genera ANG I. Consiste de una proteína de 452 aminoácidos y es sintetizado como preangiotensinógeno principalmente en hígado, riñón y SNC. (Campbell, 1986). La síntesis de angiotensinógeno es estimulada por varias hormonas como ANG II, glucocorticoides y TRH entre otras (Ben-Ari, 1988). Dado que la concentración de ANG II plasmática es modificada por los niveles de síntesis de angiotensinógeno (Tanimoto, 1994), no es entonces sorprendente que un elevado nivel de síntesis del precursor haya sido asociado a algunos tipos de hipertensión esencial (Hata, 1994).

#### Formación de otros ligandos angiotensinérgicos:

Una vez formada la ANG II es convertida a **angiotensina III (ANG III)** por la aminopeptidasa A, o por actividades semejantes a esta enzima, que cliva el residuo aspartil (Healey, 1993). La vía catalítica de metabolitos activos continúa con el clivaje mediado por aminopeptidasa N para formar **angiotensina IV (ANG IV)**. Una serie de endopeptidasas, como por ejemplo quimiotripsina, son capaces de clivar los residuos valina, tirosina e isoleucina reduciendo así ANG IV a fragmentos peptídicos y/o a sus aminoácidos constituyentes (Johnston, 1990). Fig. 4.1.



Por otra parte angiotensina II (1-7) es formada por carboxipeptidasa P que cliva el residuo fenilalanina de ANG II. Angiotensina II (1-7) es convertida a Angiotensina II (2-7) por aminopeptidasa A (De Silva, 1988). Además de estas vías de formación de angiotensinas existen otras alternativas como la formación de ANG III independiente de ANG II así como también la conversión del angiotensinógeno a ANG I y ANG II independiente de renina (Dzau, 1993).

### 1.9.3 Acciones clásicas del SRA

Dos péptidos, el factor natriurético atrial y ANG II juegan papeles preponderantes en el mantenimiento de fluidos corporales. Desviaciones del balance de fluidos inducen la liberación de ANP y ANG II en direcciones opuestas. ANG II es la principal hormona de la hipovolemia que se dispara cuando el volumen sanguíneo disminuye. En este aspecto, la liberación de renina desde el riñón, que es el mayor precursor de la renina circulante, se

estimula tanto por una caída de la resistencia periférica como por una disminución de la presión arterial (hemorragias, dietas pobres en sodio, etc.).

Un aumento transiente en los niveles circulantes de ANG II causan vasoconstricción y eventualmente hipertensión. Estos efectos presores rápidos se deben a un incremento en la resistencia periférica conjuntamente con un aumento en la liberación de catecolaminas de la médula adrenal, el aumento y la sensibilización de los componentes noradrenérgicos simpáticos. Sin embargo se considera desde hace ya muchos años, que los efectos hemodinámicos más importantes del RAS se dan a largo término. Estos se producen por un incremento en la liberación de aldosterona de la corteza adrenal, un incremento en la reabsorción de Na renal mediada por una mayor vasoconstricción renal y un incremento en la transmisión noradrenérgica en este órgano. La participación del SNC en estos efectos se discutirá más adelante.

Una importante acción de este sistema es su participación en el remodelado vascular y cardíaco. Sus efectos incluyen aumentos en migración celular, síntesis de proteínas de la matriz extracelular e hipertrofia.

Dado el desarrollo del conocimiento de este sistema, el SRA fue considerado en un principio como un sistema exclusivamente endócrino. Esta concepción fue cuestionada por primera vez, en 1968 por el Laboratorio de Sustancias Vasoactivas del I.I.M. Alfredo Lanari donde mostraron que glomérulos aislados eran capaces de producir ANG I y ANG II a partir de angiotensinógeno local (Finkielman, 1969) y, además, en el cerebro de ratas se detectaba la presencia de ANG I a pesar de que éstas estaban nefrectomizadas (Fischer-Ferraro, 1971). Más tarde, se describió por primera vez la existencia de un RAS independiente en el cerebro (Nahmod, 1976). Así comenzó a surgir la noción que, además del SRA circulante, este sistema existiría, generado y regulado de manera parcial o totalmente independiente, en diversos tejidos (Kato, 1993; Danser, 1994). Hoy es ampliamente aceptado que hay SRA totalmente independientes del circulante, o intrínsecos, que actúan al menos paracrinamente, como los existentes en cerebro, corazón, glándula adrenal, paredes vasculares, hígado, riñón, ovarios y testículos entre otros (Srnia, 1997; Phillips, 1993; Harris, 1996).

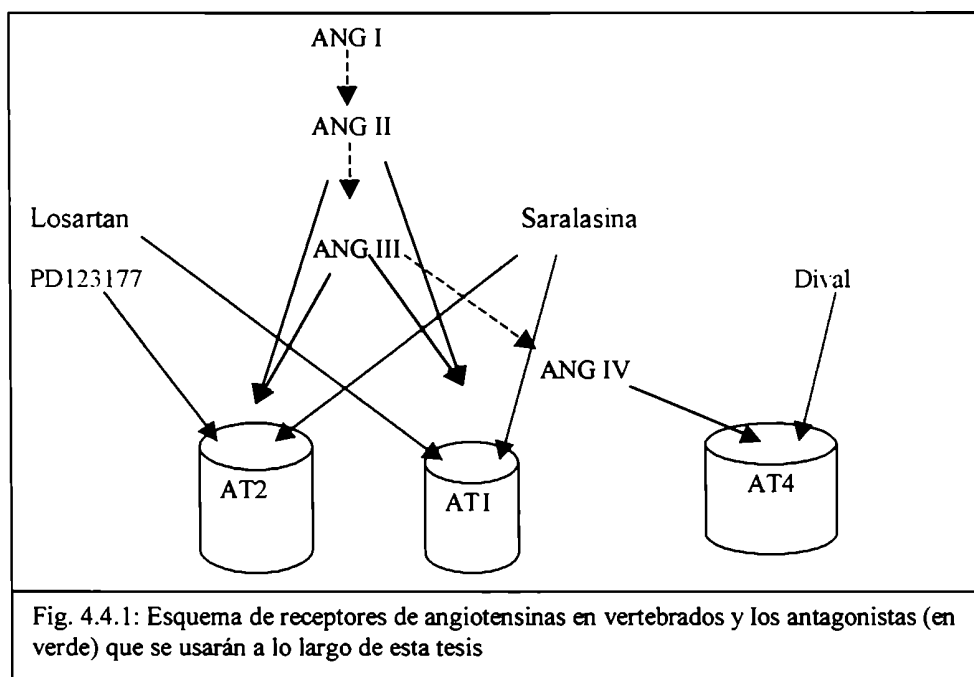
#### 1.9.4 Receptores de angiotensinas:

Los receptores que intervienen en la multiplicidad de efectos endócrinos, paracrinós, autocrinós e intracrinós de las angiotensinas sobre virtualmente todos los sistemas celulares y tisulares están hoy bastante bien definidos en mamíferos. Las acciones de ANG II y ANG III son ejercidas mediante una familia de receptores específicos que han sido disecados mediante análogos peptídicos con efectos antagonistas (Peach, 1977). Uno de los más potentes es la saralasin (Sar1-Ile8-ANG II) que, como todos los antagonistas de este tipo, tiene una vida media relativamente corta en los fluidos corporales (Page, 1974). El desarrollo de antagonistas de receptores no peptídicos ha facilitado la identificación de subtipos de receptores en ratas, ratones y humanos para angiotensinas; describiéndose los subtipos de receptores para ANG II de vertebrados designados como AT1 y AT2 (Bumpus, 1991). Los receptores AT1 presentan una alta afinidad por el losartan (y los derivados relacionados) y una afinidad baja por PD 123177. En contraste, el receptor AT2 tiene una afinidad alta por PD 123177 pero una afinidad baja por el losartan (DUP) (Timmermans, 1993). La mayoría de las acciones fisiológicas de ANG II son mediadas por AT1. Ambos subtipos son miembros de la familia de receptores que poseen una estructura de siete dominios transmembrana y están acoplados a sistemas efectorios mediante la regulación de proteínas que son activadas por la unión de GTP, proteínas tipo G (Timmermans, 1993). La mayoría de los AT1 descritos (AT1a y AT1b en roedores) están acoplado a  $G_{q\alpha}$ , resultando la activación del mismo en un aumento de fosfolipasas (PLC- $\beta$ , PLD y PLA<sub>2</sub>), liberación de IP3, diacil glicerol y ácido araquidónico, alterando la conductividad para el calcio y activando una isoforma de PKC (Hunyady, 1994; Misery, 1998; Kai, 1998). En algunos casos, la  $G_{i\alpha}$  modula los niveles de AMPc alterando de esta manera la fosforilación de proteínas claves y contribuyendo al efecto biológico final (Timmermans, 1993). Por otra parte, aunque los datos son controvertidos respecto a AT2, éste también parece estar acoplado a proteína G y probablemente muchos de sus efectos estén mediados por bradicinina (Gohlke, 1998). Mientras que la homología de los receptores AT1 entre especies es muy



alta, los receptores AT1 y AT2 tienen una homología pequeña, sólo 32% de identidad de aminoácidos (Misery, 1998) (Fig. 4.4.1).

Además de los receptores para ANG II, AT1 y AT2, que reconocen también ANG III y otros fragmentos activos de estos péptidos, existen receptores específicos para angiotensina IV (ANG IV), un metabolito activo de este sistema que no se une a AT2 y AT3, pero sí a sitios específicos denominados AT4. Receptores de este tipo se describieron en varios tejidos de vertebrados. e. g. riñón, corazón y diversas áreas cerebrales. Concerniente a este receptor, se conoce muy poco acerca de su estructura y las señales intracelulares que se disparan luego de su activación. Hace poco tiempo se ha desarrollado antagonistas específicos para este receptor. e. g. Dival (Wright, 1997) (Fig. 4.4.1).



### 1.9.5 Regulación de funciones celulares

Como se indicó previamente, la ANG II causa vasoconstricción de la musculatura lisa y tiene efectos ionotrópicos positivos en músculo cardíaco dependientes en parte de calcio. Desde hace relativamente poco tiempo se sabe que las angiotensinas actúan como factores de crecimiento,

especialmente en células vasculares, cardíacas, adrenomedulares y neuronales (Kanashiro, 1995; Okuda, 1996; Morgia, 1996). Promueve la síntesis de proteínas mediante la inducción de la vía RAS/RAF/MAP-kinasa (Eguchi, 1999), de c-fos y c-jun (Bhat, 1994) con el consiguiente aumento en la actividad transcripcional del complejo AP-1, además de otros factores de transcripción, e.g. NFkappa-B (Han, 1999). También, al igual que muchos neuropéptidos, incrementa los niveles intracelulares de fosforilación en tirosinas (Marrero, 1998).

Todos estos efectos están mediados por AT1 y, resulta interesante de recalcar que, para AT2 se han descrito efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular, actuando así en contra de los efectos mediados por AT1 probablemente debidos a una disminución de la actividad MAP-kinasa (Nakajima, 1995). Mas aún, se conoce que ANG II estimula la expresión de factores de crecimiento y diferenciación celular. Por otra parte se conoce que el oncogen *mas* codifica para un receptor de ANG II, convirtiendo a ésta en un factor mitogénico (Bunnemann, 1992). El hecho que el RAS esté marcadamente aumentado durante el desarrollo y que la expresión de receptores AT1 y AT2 cambie dramáticamente durante la evolución fetal y postparto, ha llevado a especular que el sistema tiene un papel central en los procesos de maduración y diferenciación celular (Wilkes, 1985).

Además de estos subtipos de receptores, se ha descrito un receptor específico para ANG IV, llamado AT4 y cuya cascada de segundos mensajeros se desconoce (Wright, 1995).

### **1.9.6 Sistema Renina Angiotensina Central**

#### **Presencia y funcionalidad del sistema renina angiotensina central**

La primera descripción acerca de la presencia, y funcionalidad, del RAS central comienza con estudios hechos en el I.I.M.A.Lanari donde Nahmod, Goldstein, Finkelman y Ferraro describieron la presencia de renina y angiotensina en diversas áreas del SNC canino (Fischer-Ferraro, 1971; Nahmod, 1972, 1976) y, como dijimos anteriormente, plantearon por primera vez que el RAS, además de ejercer sus acciones cardiovasculares y

hemodinámicas mediante ANG II sérica, también lo hacía de manera independiente, o intrínseca, en diversos tejidos donde su síntesis y regulación es completamente local. Los precursores y las enzimas necesarias para la formación y metabolismo de las formas fisiológicamente activas de angiotensinas han sido localizados en el CNS (Richoux, 1988, Ganten, 1977; Fuxe, 1980) tanto como varios subtipos de receptores angiotensinérgicos. La demostración de que el SNC es capaz de sintetizar tanto renina como el precursor angiotensinógeno han provisto de las pruebas finales de la existencia de un RAS central independiente (Stornetta, 1988). La noción que las angiotensinas activas actúan como verdaderos mensajeros químicos (neurotransmisores) en el SNC es hoy aceptada (Ferguson, 1998).

La presencia de renina, mediante hibridización *in situ* e inmunocitoquímica, ha sido descrita en varias áreas, e.g. corteza frontal, amígdala, hipotálamo (Fuxe, 1980). En cuanto al precursor, niveles relativamente altos de mRNA de angiotensinógeno se encuentran en hipotálamo, cerebro medio, entre otras áreas a (Lynch, 1987). Mientras que los análisis por hibridización *in situ* demostraron que la gran mayoría del precursor es sintetizado en astrocitos (Stornetta, 1988), estudios usando diferentes anticuerpos muestran que este péptido se encuentra tanto en astrocitos como en neuronas, e.g. en área preóptica, formación hipocampal, corteza amigdaloides, hipotálamo, órganos circumventriculares (OCVs) (Bunemann, 1991).

Las dos principales vías angiotensinérgicas reveladas por inmunohistoquímica contra los diferentes péptidos del sistema son: el cerebro anterior que conecta los órganos circumventriculares hacia el núcleo preóptico medial, núcleo paraventricular y núcleo supraóptico y la vía que conecta principalmente el hipotálamo con la médula oblongata y espina dorsal (Bunemann, 1991). Se han descrito, en estas áreas, fibras y/o cuerpos neuronales inmunorreactivos. La localización de subtipos de receptores de la angiotensinas AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> y AT<sub>4</sub>, en cerebro de mamíferos, ha sido revisada en diversas oportunidades (Wright, 1997; Lenkei, 1997).

La distribución de todos los componentes de RAS, está en concordancia con las funciones de las estructuras donde se encuentran y las funciones fisiológicas "clásicas" atribuidas, especialmente a la estimulación de receptores

AT1 centrales: balance hídrico, regulación cardiovascular e influencias sobre cambios hormonales y comportamentales asociados a procesos reproductivos y memoria.

El compendio de acciones centrales que ejercen las angiotensinas es:

- *Aumento de la presión arterial.*
- *Estimulación de la ingesta de agua.*
- *Estimulación de la ingesta de sal (halofilia)*
- *Liberación de: vasopresina, factor liberador de cortisol, ACTH y prolactina*
- *Estimulación de la síntesis de serotonina*
- *Liberación de acetilcolina, norepinefrina y serotonina.*
- *Alteración de estados de humor*
- *Aumento de actividades exploratorias*
- *Inhibición de conductas sexuales*
- *Analgesia mediada por opiodes*
- *Altera procesos de memoria*

Todas estas acciones del SRA central no son independientes del sistémico. Las angiotensinas circulantes influyen las acciones centrales de las mismas a través de receptores ubicados en los OCVs, que están muy vascularizados y poseen una barrera hematoencefálica reducida, permitiendo el pasaje de hormonas a áreas cerebrales que están localizadas cerca de los ventrículos cerebrales (McKinley, 1998). Uno de los aspectos destacables acerca del SRA central es que, al igual que varios sistemas neuropeptidérgicos, no existe en muchas áreas una colocación de todos los componentes de éste sistema en un mismo tipo celular. Por ejemplo es evidente la ausencia de precursor en muchas células inmunopositivas para angiotensinas y la falta de co-localización de receptores y péptidos neuroactivos. La hipótesis formulada por Fuxe, tomando a varios neuropeptidos como modelo, sugiere la captación del precursor por neuronas y el procesamiento extra o intracelular para generar los metabolitos activos del sistema (Bunnemann, 1991). Muchas de estas células también son capaces de endocitar ANG II y degradarla a ANG IV o ANG

II(1-7) (Ganong, 1994). Si estos procesos tienen un significado fisiológico o son caminos meramente degradativos es algo que aún queda por decidir.

### Angiotensinas centrales y el control del balance hídrico y cardiovascular

En términos de integración fisiológica en vertebrados, las funciones centradas en el hipotálamo tienen un papel crucial en la integración de los sistemas fisiológicos que controlaran el *milieu interior*. Estos procesos hipotalámicos, e.g. conservación de agua y sed, incluyen entre otros, el control de comportamientos ingestivos, funciones cognitivas y control de procesos excretores, tendientes a corregir deficiencias corporales. Junto con la emergencia filogenética, en vertebrados, de apetitos por agua y sal, aparecieron capacidades regulatorias para activar la búsqueda y obtención de sustancias de las cuales el animal está en deficiencia (Denton, 1996).

Las alteraciones en presión osmótica, presión arterial y contenido iónico de los fluidos corporales, censadas tanto a través de áreas hipotalámicas como extra craneales, disparan diversos mecanismos fisiológicos implicados en la sed y apetitos específicos. Concretamente, ANG II parece estar involucrada en la génesis de la sed o, al menos, es un neurotransmisor en las redes neuronales de esta sensación, además de ser un estímulo poderoso en vertebrados que toman agua. Cuando se inyecta ANG II directamente en las áreas sensibles del cerebro, se produce un aumento inmediato en la toma de agua, seguida por un aumento más lento en ingesta de sodio. Las cantidades de líquido ingeridas luego de los primeros minutos de la inyección del péptido, pueden exceder lo que el animal bebería espontáneamente en el curso de sus actividades normales en 24 h (Simpson, 1973). Este efecto es razonablemente independiente de la respuesta presora (Lind, 1982). El aumento provocado por las angiotensinas en la ingesta de sodio aparece más lentamente pero es más persistente. Todos estos efectos son bloqueados por la infusión de antagonistas de AT1 (Mathai, 1998).

Los aumentos en ANG II circulante tienen efectos similares sobre la ingesta de agua, aunque pueden ser confundidos en parte con el incremento de

la presión sanguínea. Existen numerosas evidencias que el RAS endógeno renal puede generar bastante ANG II circulante como para provocar sensación de sed (Weisinger, 1997). Varias de las áreas que componen los OCVs, proporcionan los sustratos neuroanatómicos para los efectos de ANG II y ANG III sobre sed, apetito de sodio, y control cardiovascular. Además, estas áreas poseen extensas conexiones con el hipotálamo, el sistema límbico y el tronco cerebral (Olfield, 1995). Se considera que las angiotensinas endógenas actúan como verdaderos neurotransmisores o como neuromoduladores en las redes neuronales a través de las cuales la ANG II circulante ejerce efectos centrales (Jhamandas, 1989, Jhamandas, 1989, Ferguson, 1996; Bains, 1995). Asimismo, varios grupos de neuronas cuyos somas contienen ANG II en el hipotálamo, regulan la liberación de hormonas hipofisarias (Phillips, 1987; Franci, 1997; Veltmar, 1992, Lenkei, 1999), entre ellas la vasopresina.

Las reconocidas influencias de las angiotensinas centrales sobre la resistencia vascular son ejercidas tanto por la estimulación del sistema nervioso simpático como por una estimulación en la liberación de vasopresina (Wright, 1992).

La mayoría de estos efectos parecen estar mediados por el receptor AT1 y hay suficientes razones para creer que el verdadero ligando endógeno de estos efectos no sea ANG II sino ANG III (Wright, 1997; Fitzsimons, 1998).

Dados los muchos casos de separación anatómica entre los sitios de producción de angiotensinas y la ubicación de los receptores específicos, se ha considerado que estos neuropéptidos pueden actuar como agentes paracrinós a una distancia no sináptica de su lugar de liberación. Las desigualdades anatómicas entre los sitios de producción y receptores son menos evidentes en sistema límbico y estructuras del tallo cerebral, responsables, en parte, de la homeostasis de fluidos corporales y del control de la presión sanguínea. Las estructuras límbicas son ricas en otros péptidos neuroactivos, algunos de los cuales tienen efectos poderosos en la ingesta de agua. Ellos y muchos neurotransmisores clásicos no peptídicos pueden actuar recíprocamente con ANG II aumentando o inhibiendo la conducta de beber (Fitzsimons, 1998).

En conclusión, dado que la inmunorreactividad para ANG II y receptores se distribuye ampliamente en el SNC, es improbable que este péptido pueda tener un papel circunscripto a los efectos de la ANG II circulante. Los péptidos

angiotensinérgicos activos generados a partir de los precursores cerebrales pueden alterar significativamente diversos procesos como diferenciación celular, regeneración, remodelado neuronal y aprendizaje y memoria. Por ello, Fitzsimons (Fitzsimons, 1998), considera que una de las cuestiones más atractivas con respecto al papel principal de la ANG II, es determinar la modalidad de su acción. Propone tres modalidades de acción: a) como una *hormona* que es disparada en casos de hipovolemia y que participa en el mantenimiento del volumen sanguíneo, b) como un *neurotransmisor* o *agente paracrino* con un papel privilegiado en las vías nerviosas que están involucradas en sed y apetito de sodio, c) como un *organizador neuronal* involucrado especialmente en el apetito de sodio.

Los efectos del SRA centrales en la homeostasis de fluidos corporales parecen estar representados en todos los vertebrados. Uno de los modelos más atractivos donde este sistema se ha estudiado, es el de peces que cambian de hábitats con diferentes condiciones de salinidad. En efecto, se ha demostrado en peces teleósteos que el SRA está involucrado en el mantenimiento de la presión arterial y el volumen sanguíneo cuando estos animales migran entre ambientes de agua dulce y agua marina (Wilson, 1984). Una de sus principales acciones es regular la sed durante estos cambios, promoviendo la ingesta de agua en estos peces eurihalinos (Takei, 1979) y es aún más potente en peces adaptados a agua de mar (Balment, 1985). La distribución central de ANG II en peces es similar a la de roedores. Los niveles de ANG II en peces mantenidos en agua de mar son altos comparados con aquéllos que están adaptados a aguas salobres. Los cambios en nivel del péptido parecen ser principalmente hipotalámicos (Galli, 1996). La interacción de ANG II y la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) que se ha visto en mamíferos también está presente en peces (Keller-Wood, 1986; Hirano, 1978). Este efecto, más la capacidad de ANG II de incrementar la ingesta de agua, forman parte de uno de los mecanismos adaptativos básicos para la aclimatación al agua de mar (Fuentes, 1997). Galli y Phillips (Galli, 1996) plantean la posibilidad de un mecanismo de ying y yang entre los niveles centrales de factor natriurético atrial en y la ANG II en peces y mamíferos. También se ha demostrado en anfibios que los

componentes del RAS tienen una función dipsogénica a ambos lados de la barrera hematoencefálica (Hillaryd, 1998).

Otra función atribuida a las angiotensinas centrales en mamíferos es desempeñar un activo papel en el desarrollo del comportamiento sexual y la regulación cíclica de hormonas reproductivas (Saavedra, 1992). Las angiotensinas estimulan en ratas preñadas la liberación de LH y LHRH, entre otras hormonas sexuales, (Sernia, 1997) inhiben el comportamiento copulatorio de machos (Clark, 1989) y estimulan la ovulación de las hembras (Pellicer, 1988; Yoshimura, 1997). Esta clase de efectos también parece encontrarse en insectos donde ANG II estimula la producción de hormonas sexuales en testículos de insectos (Loeb, 1998).

#### **1.9.7 El sistema Renina-Angiotensina en invertebrados**

Antes de 1992, poco era conocido acerca de este péptido en invertebrados, excepto en sanguijuelas. En este grupo de anélidos, el medio interno de las especies de agua dulce es hipertónico con respecto a su entorno, lo cual lleva a un constante in flujo de agua que es compensado por la actividad de los nefridios. El grupo de Salzet (Salzet, 1992) describió que ANG II ejerce un efecto diurético en sanguijuelas y, además, caracterizó un péptido central bioquímicamente semejante a ANG II (Salzet, 1993) [En vertebrados se conoce que ANG II puede tener efectos diuréticos o antidiuréticos dependiendo de las dosis administradas (Gray, 1989)]. En 1995, se secuenció ese péptido central endógeno y se caracterizó como ANG II amida, siendo el primer trabajo sobre algún componente de este sistema en invertebrados y, sorprendentemente, el primer trabajo donde se caracterizó completamente a un péptido de esta familia aislado del SNC en todo el reino animal (Laurent, 1995a). El precursor es de 19 kDa (en mamíferos es de 60 kDa) y parece ser un precursor de varias hormonas, hecho típico en invertebrados (De Loff, 1990). La siguiente tabla (4.1), reconstruida sobre la base de datos de este mismo grupo (Laurent, 1995a), sugiere fuertemente que este sistema central apareció tempranamente en la evolución.



Tabla 4.1

<b>Mamíferos:</b>	
Humana	NH <sub>2</sub> -Asp-Arg-Val-tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-COOH
<b>Aves:</b>	
Gaviota	NH <sub>2</sub> -Asp-Arg-Val-tyr-Val-His-Pro-Phe-Ser-Leu-COOH
<b>Reptiles:</b>	
Tortuga	NH <sub>2</sub> -Asp-Arg-Val-tyr-Val-His-Pro-Phe-His-Leu-COOH
<b>Peces:</b>	
Salmón	NH <sub>2</sub> -Asp-Arg-Val-tyr- Val -His-Pro-Phe-Asn-Leu-COOH
<b>Anélidos:</b>	
Sanguijuela	NH <sub>2</sub> -Asp-Arg-Val-tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-COOH

El péptido descrito en sanguijuelas es ANG II-amida, que difiere del de vertebrados por una amidación carboxy-terminal y es 100 veces más potente que ANG II en su efecto diurético luego de alimentarse los animales con sangre (Laurent, 1995a). Esta ingesta produce un aumento en la cantidad de péptido similar a ANG II (Salzet, 1992) y además esta diuresis es similar a la que ocurre en insectos hematófagos luego de la alimentación. La existencia de ANG II-amida sugiere que en esta especie el precursor posee una glicina en la posición 9 en lugar de histidina como en vertebrados y esta amida proviene de la actividad enzimática de un sistema de  $\alpha$ -amidación (Salzet, 1995).

Estos resultados junto con la descripción de actividades bioquímicas similares a la renina (Salzet, 1997; Laurent 1995b, 1995c) y a la enzima convertidora de angiotensinas (ECA), involucradas en la hidrólisis de ANG I y bradisinina (Laurent, 1996a, 1996b) en este animal, sugieren la existencia de un RAS completo en sanguijuelas (Laurent, 1998).

En poliquetos la caracterización inmunológica de péptidos relacionados con ANG I, ANG II y oxitocina (OT) se detectó en el cerebro y el cordón del nervio ventral así como en pericardio y estructuras periféricas (nervios periféricos, células del epitelial, intestino y nefridios). Además, ambos péptidos aparecen involucrados en procesos osmorregulatorios de esta especie (Fewou, 1995).

Otro importante dato para tratar de evaluar el papel de las angiotensinas en la homeostasis de fluidos en invertebrados surge de la observación que ANG II está involucrada también en la ingesta de agua en *Limax maximus* (Makra, 1985).

Por otra parte, se han detectado neuronas con inmunorreactividad similar al angiotensinógeno en neuronas de ganglio cerebral de *Aplysia californica*, en neuropilos del mismo ganglio y en los ganglios pedal y pleural (Gonzáles, 1995).

### Un párrafo especial para la ECA en invertebrados

Este apartado especial se debe al interés que ha despertado en los últimos años esta enzima clave en el procesamiento de péptidos en invertebrados.

Las quimasas son una familia de serino-proteasas que están involucradas en diversas funciones celulares, entre ellas el procesamiento de hormonas. Todas tienen en común un parecido con la quimiotripsina: hidrolizan péptidos en el extremo carboxi-terminal de amino ácidos con residuos aromáticos hidrofóbicos (Kinoshita, 1991). La actividad formadora de ANG II es el estado más primitivo de las quimasas y su especificidad, esto es la capacidad de formar ANG II sin degradarla posteriormente, surgió o ya estaba presente en los primeros vertebrados (Unnikirishnan, 1996).

En *Drosophila* ha sido bien caracterizado el gen Race (gen relacionado a ECA). El mismo se expresa en distintos estadios embrionarios y codifica una proteasa de secreción con un 42% de identidad con ECA de mamíferos (Cornell, 1995). En ella existen grandes regiones bien conservadas que contienen los dominios del sitio de unión a Zinc y el centro con actividad catalítica proteasa. La mutación de este gen conduce a larvas normales pero es letal durante el estadio de pupación y, además, las combinaciones heteroalélicas conducen a machos estériles (Takei, 1995).

Homólogos de ECA también se han identificado en otros insectos como *Musca domestica* y *Haematobia irritans exigua* donde se han clonado y caracterizado bioquímicamente (Wijffels, 1996, Lamango, 1997). La

localización de ECA en el sistema nervioso central y los órganos reproductores de varias especies de insectos sugiere que esta enzima es de importancia fisiológica en estos tejidos (Lamango, 1997). Inmunorreactividad similar a ECA está presente en áreas de neuropilos del cerebro de todos los insectos investigados y hace pensar en un papel activo para esta enzima en el metabolismo de neuropéptidos. En el cerebro de la cucaracha *Leucophaea*, la inmunorreactividad a ECA es abundante tanto en el pericardio neuronal así como en los neuropilos. La localización de ECA en células neurosecretorias es consistente con la generación de hormonas peptídicas activas. Se encontró también inmunorreactividad en los testículos de varios insectos, sugiriendo un papel importante en la reproducción (Schoofs, 1998; Isaac, 1998; Loeb, 1998).

La única descripción en crustáceos de algún componente de este sistema ha sido hecha en el cangrejo azul, *Callinectes sapidus*. En ella se describe la presencia de actividad semejante a ECA, con la distribución en tejidos y actividades específicas similares a las de vertebrados (Smiley, 1994). La actividad específica más alta fue la encontrada en branquias y en hepatopáncreas

#### **1.9.8 Influencia de las angiotensinas sobre procesos de memoria**

Una de las cuestiones que más controvertibles es si las angiotensinas influyen sobre procesos de memoria.

Rolls (Rolls, 1972) y Graeff (Graeff, 1973) informaron que inyecciones de ANG II dadas en el área preóptica lateral y septal, de animales entrenados en un paradigma operante que les permitía obtener agua presionando una palanca, hacía que se comportasen como animales privados de agua por 24 h. Estos trabajos pueden considerarse como el inicio de muchas investigaciones acerca del efecto de las angiotensinas sobre proceso de memoria, con resultados muchas veces contradictorios.

Uno de los primeros trabajos mostraron que la administración intracerebroventricular (icv) de renina inmediatamente antes del entrenamiento en ratas (Koller, 1979) tiene efectos amnésicos. En 1977 Morgan y Routtemberg (Morgan, 1977) presentaron resultados indicando que

la administración de ANG II en el *striatum dorsal* luego de un entrenamiento de evitación pasiva, interrumpe la formación de la memoria. En ninguno de estos casos los efectos pudieron verse cuando las sustancias se administraban varias horas después de las sesiones de entrenamiento.

En estudios posteriores, se demostró que el déficit mnésico producido por renina es dosis dependiente y la administración de antagonistas selectivos para el receptor AT1 atenúan el efecto amnésico (De Noble, 1991).

Por otro lado, en pacientes hipertensos tratados con inhibidores de la ECA (Zubenko, 1984), al igual que en otros mamíferos (Costall, 1990; Flood, 1993), se podían detectar efectos ansiolíticos y una mejora en procesos de memoria aún cuando las funciones colinérgicas eran interferidas (Costall, 1989).

En esta misma línea, Mondadori (Mondadori, 1990) encontró que dos inhibidores de la ECA administrados antes del entrenamiento disminuyen la amnesia provocada por un shock eléctrico en varios paradigmas. Es interesante que en humanos, altos niveles de ECA (debido a un alelo particular en el locus del gen para esta enzima) se correlacionan con un déficit en la memoria (Amouyel, 1996). Es importante advertir aquí que todos los efectos inducidos por inhibidores de ECA son difíciles de evaluar en cuanto a su especificidad, ya que esta enzima interviene en las rutas metabólicas de otros péptidos neuroactivos, tales como bradicinina, Sustancia P, encefalina, colesistoquinina y neurotensina.

Se ha descrito que ANG II y ANG IV excitan neuronas hipocámpales y, el primero inhibe la Potenciación a Largo Término (LTP) en este área, efecto mediado por receptores AT1 (Alberch, 1997). Este mismo subtipo de receptor es el que interviene en la inhibición de LTP producida por etanol y diazepam, cuyos efectos son atribuidos por algunos investigadores a la liberación presináptica de ANG II de las aferencias hipotalámicas laterales que proyectan directamente al giro dentado (Wayner, 1997<sup>a</sup>, 1997<sup>b</sup>).

Se vio en ratones que un antagonista para AT1, losartan, posee una actividad ansiolítica (Barnes, 1990). Sin embargo, en otro trabajo donde se usan dos modelos de ansiedad y dos de memoria de trabajo en ratas y ratones, además de un test con refuerzo en un laberinto, se muestran que

tanto antagonistas AT1 como AT2 no modifican los niveles de ansiedad ni de memoria de trabajo, aún cuando se use escopolamina como modelo amnésico (Shepherd, 1996).

Se han descrito para angiotensinas efectos facilitadores sobre aprendizaje y memoria. El primer antecedente data de 1983 (Baranoska, 1983), donde se encontró que 1nmol de ANG II dado ICV aumenta la tasa de adquisición en una respuesta de evitación condicionada en ratas. Este efecto persiste por varios días, es dosis-dependiente y altas dosis de este péptido no son capaces de mejorar el aprendizaje, mostrando así una relación dosis-respuesta con forma de U invertida típica para la acción de muchos neuropéptidos (Kovacs, 1994a).

Se demostró también que el antagonista de ANG II sarile (Sar-1, Ile-8 ANG II), facilita el aprendizaje de este paradigma de manera similar a ANG II. Basados en estos estudios, se sugirió que el efecto facilitador de la ANG II dependía de la secuencia de aminoácidos 3-7 (Brasko, 1991). El mismo tratamiento mostró efecto facilitador de la memoria en un laberinto en T cuando era administrado inmediatamente después del entrenamiento pero no antes de la sesión de evaluación (Braszko, 1988b; Braszko, 1987). El grupo de Braszko mostró que la inhibición de receptores AT1 por losartan eliminaba los efectos facilitadores de ANG II y ANG II(3-7) en un aprendizaje de evitación pasiva, mientras que un antagonista para AT2 lo hace solo parcialmente (Braszko, 1996). Estos autores describieron también que ninguno de estos antagonistas tiene, por sí mismo, efectos mnésicos. Mediante el uso de una respuesta de condicionamiento activo, donde el animal deba moverse de un compartimento al otro con el fin de evitar un choque eléctrico. Braszko *et. al.* (Braszko, 1996) encontraron que un antagonista de AT1 (losartan) revertía el efecto facilitador de ANG II y ANG II(3-7), pero no con antagonistas para AT2. En un tercer paradigma (reconocimiento de un objeto nuevo), ANG II y ANG II(3-7) causaban un aumento en el tiempo de reconocimiento, el que era revertido antagonistas para AT1 y AT2 (Braszko, 1997; Braszko, 1996; Kulakowska, 1996).

Sólo los péptidos que contienen la secuencia ANG II(3-7) son capaces de generar los efectos comportamentales descritos (Braszko, 1996; Holly, 1992). Esos péptidos modulan el sistema dopaminérgico central, que es clave en procesos cognitivos, como lo demuestra el hecho que los efectos de

facilitadores de ANG II en paradigmas de evitación activa y pasiva son eliminados por el tratamiento con 6-ODHA en la amígdala central (Winnika, 1997). De ahí entonces que sea posible especular que la capacidad de los antagonistas AT1 Y AT2 para bloquear los efectos facilitadores de estos péptidos, se encuentre unida a la facultad que tienen de revertir los efectos estereotípicos similares a la dopamina que tienen ANG II y ANG II(3-7). Sin embargo, Braszko hace notar una contradicción: mientras que los efectos comportamentales de ANG II son menores que los de ANG II(3-7), la afinidad de este último es 10.000 veces menor para AT1 y AT2 que la ANG II (Braszko, 1996). Además, es importante tener en cuenta que el antagonista de AT1, losartan, también es capaz de bloquear el receptor para taquiquininas NK3 que, por otra parte, parece estar involucrado en procesos mnésicos probablemente mediante su capacidad de aumentar la liberación de acetilcolina (Chertien, 1994).

Aparte de los efectos de angiotensinas mediados por AT1 y AT2, Braszko describió por primera vez que, al igual que los péptidos que se unen a estos receptores, ANG IV (que no interacciona con AT1 o AT2) estimula el comportamiento exploratorio, la evocación en un aprendizaje de evitación pasiva y, facilita la adquisición de un paradigma de evitación activa (Braszko, 1988a). Años después se describió la presencia de receptores AT4 en áreas cerebrales de rata que intervienen en procesos de aprendizaje y memoria (Wright, 1993; Wright, 1997). Wright confirmó los efectos de ANG IV en procesos mnésicos y desarrolló un antagonista competitivo de ANG IV, Divalinal-ANG IV, que a su vez tiene efectos amnésicos en un paradigma de evitación pasiva, pero no afecta la actividad exploratoria (Wright, 1995).

Es importante notar aquí que la ANG II es un precursor para la formación de ANG III, ANG II(1-7) y ANG IV. Estos dos últimos son metabolitos activados en el SNC y existen evidencias sugiriendo que la ANG III es el ligando primario del receptor AT1, y que ANG I y ANG II serían moléculas precursoras (Wright, 1997). Desde este punto de vista, los clásicos análogos peptídicos para AT1 aparecen como análogos de ANG III protegidos en su parte N-terminal (e.g. [Sar1, Ile8]ANG II).

En síntesis, los grupos de trabajo de Wright y Braszko, muestran que la administración de angiotensinas ICV mejoran procesos de memoria en varios

paradigmas. Sin embargo, Kovacks y DeWied (Kovaks, 1994a) en su revisión sobre neuropéptidos y memoria de 1994, consideran que la influencia de las angiotensinas en procesos de aprendizaje y memoria son de poca o escasa importancia. En efecto, sugieren que la influencia de ANG II sobre estos procesos puede ser explicada por la liberación de otros neuropéptidos, entendiéndolo entonces como un efecto de segundo orden. Además, estos autores destacan el papel esencial, e indiscutido, que tiene la ANG II en el metabolismo hídrico, planteándose la posibilidad de relacionar sus efectos mnésicos con la homeostasis del equilibrio hídrico.

## **Capítulo 2**

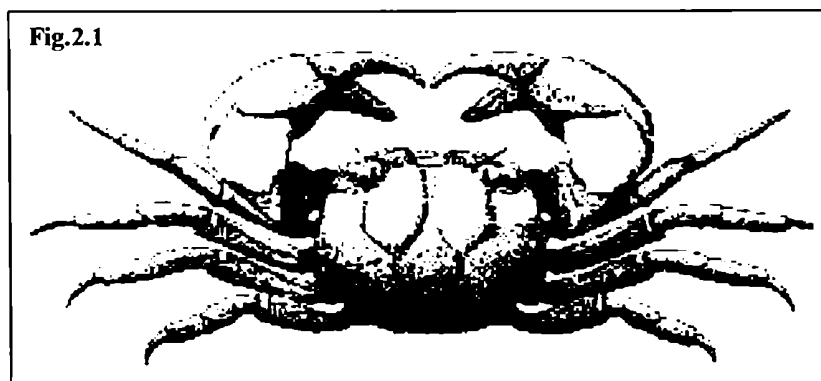
# **Materiales y Métodos**



## **2.1 Rasgos generales del modelo**

### **2.1.1 Características de *Chasmagnathus***

Se utilizaron animales de entre 2.6-3.0 cm. de ancho de caparazón; el peso húmedo promedio de esta categoría de tamaño, calculado sobre una muestra de 60 animales era de  $15\text{gr} \pm 0.2$  (Fig. 2.1).



### **2.1.2 Lugar de Captura.**

El cangrejo eurihalino semiterrestre *Chasmagnathus granulata* habita la zona costera desde el sur de Brasil, Uruguay y Argentina, ocupando los bancos de limo mesolitoral y supralitoral de la zona de transición de agua dulce y marina. En nuestro caso, el lugar de captura es en las rías de agua salobre de San Clemente del Tuyú, Prov. de Buenos Aires, Argentina. La salinidad de estas aguas se mantiene a lo largo del año entre 12 y 14‰. Luego de su captura, los cangrejos son transportados al laboratorio en recipientes especialmente diseñados para impedir el abarrotamiento de los individuos durante el transporte. Las recolecciones se realizan durante todo el año a un intervalo aproximado de 15 a 20 días.

### **2.1.3 Cuarto de mantenimiento en el laboratorio.**

Durante la permanencia en el laboratorio, los animales son mantenidos en tanques plásticos (35X48X27 cm) con un fondo de agua 2 cm de

profundidad y una densidad de 30 animales por tanque. El agua usada en los tanques de mantenimiento y en los contenedores utilizados en los experimentos, se prepara con sal marina para acuarios hw-Marimex (Winex-Alemania), salinidad de 12-14 ‰ y pH 7.4-7.6. Se mantiene un ciclo luz-oscuridad de 12L:12O (0700-1900 h.). Los animales son alimentados con alimento balanceado para conejos (Nutrientes SA, Argentina) cada tres días, y luego de la alimentación se les cambia el agua. La temperatura de este cuarto y del experimental así como también las zonas de conexión entre ellos son mantenidas en un rango de 19-22 °C.

#### **2.1.4 Equipo.**

Para estudiar la memoria contexto señal (MCS) y la memoria señal (MS), se utiliza un dispositivo automatizado que permite al experimentador trabajar con 40 animales en forma simultánea. La unidad experimental es el actómetro (Fig. 2.2a), que consta de un recipiente plástico (C) con las paredes cóncavas y el piso central circular plano, el cual se cubre con hasta 0.5 cm. de agua. El recipiente está suspendido por 3 hilos de un armazón de madera y es iluminado con una lámpara de 10W ubicada a 30 cm por sobre el animal. Una pantalla rectangular opaca (R) es movida horizontalmente por un motor, sobre el animal y por arriba de la superficie superior del armazón, produciendo una respuesta de corrida del cangrejo y consecuentemente vibraciones del recipiente. Una aguja está fijada a la base del recipiente y conectada a un transductor piezoeléctrico (P). Las vibraciones del recipiente inducen señales eléctricas proporcionales, a través del transductor. Estas señales son amplificadas, integradas durante el tiempo de registro y traducidas a una escala numérica en un rango entre 0-1530, 0-3060 o 0-4590, dependiendo de la ganancia del amplificador, antes de ser procesadas por una computadora. Cada actómetro está separado del otro por paneles de madera, quedando así aislados uno de otro. La computadora es utilizada para programar la secuencia de ensayos, la duración del ensayo, el intervalo entre ensayos, así como para monitorear los eventos experimentales.

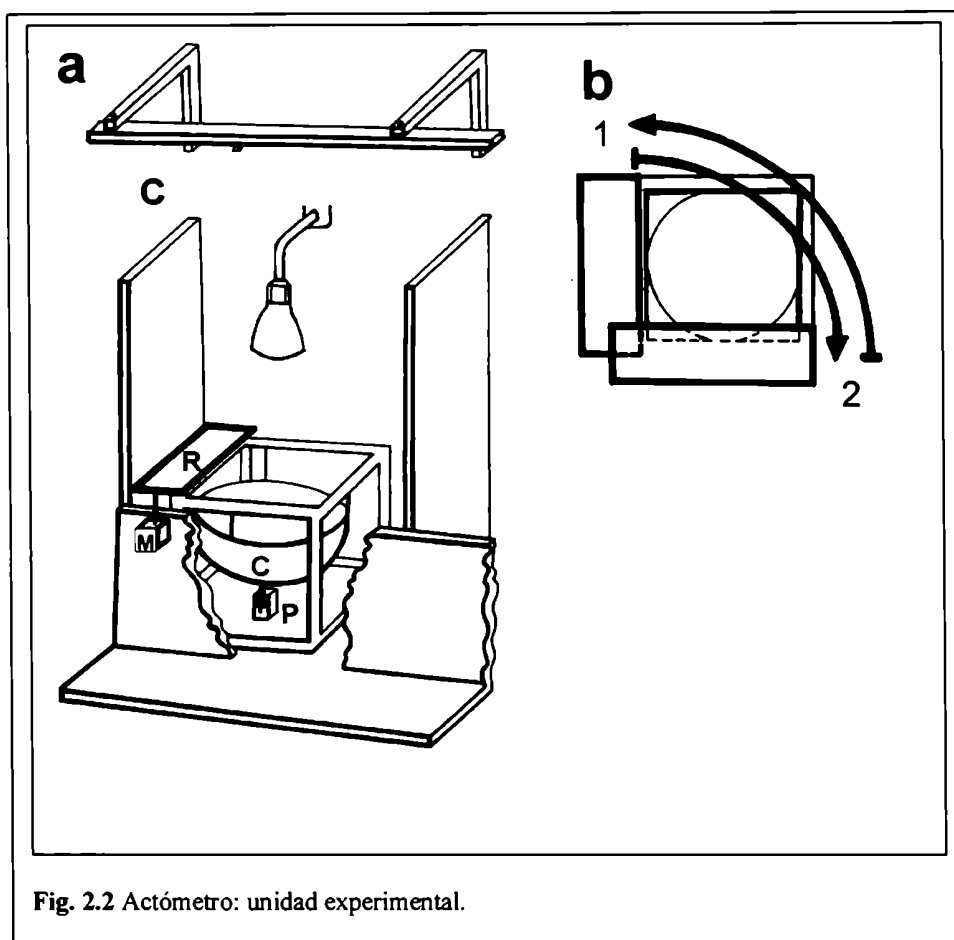


Fig. 2.2 Actómetro: unidad experimental.

### **2.1.5 Descripción del ensayo durante los entrenamientos espaciados.**

Un **ensayo** consiste de dos ciclos de pasajes sucesivos de la pantalla, (i.e., un ciclo, de 1 a 2 y de 2 a 1, Fig. 2.2b). Cada ciclo dura aproximadamente 4 seg., por lo que el tiempo total es de 9 seg. El ensayo incluye ese movimiento cíclico, con un doble propósito: primero, obtener una respuesta más conspicua mediante la acumulación de vibraciones del actómetro; segundo, aumentar la posibilidad de que la pantalla ingrese en el campo visual del animal por lados diferentes, garantizando así la estimulación similar para cada individuo independientemente de la ubicación del mismo en el actómetro. La actividad se registraba durante todo el ensayo.

### **2.1.6 Descripción de la respuesta de escape**

La **respuesta de escape** (Maldonado, 1997) consiste en la corrida del cangrejo tratando de dejar atrás a la sombra pasante. Dada la marcada concavidad del recipiente del actómetro, estos movimientos quedan limitados al piso plano del mismo. Cabe puntualizar dos características salientes de esta respuesta. Primero, comienza inmediatamente después de la entrada del estímulo en el campo visual, precedida generalmente por un pequeño salto, y siempre tiene prioridad sobre la actividad previa del animal, ya sea exploración o reposo (Korn, 1996). Segundo, el escape es una respuesta direccional, es decir, el cangrejo tiende a correr en dirección opuesta al movimiento de la pantalla.

## **2.2 Experimentos comportamentales**

### **2.2.1 Test de selección**

Antes de comenzar un experimento, los animales son trasladados desde el cuarto de mantenimiento al cuarto experimental y sometidos al test de selección: cada cangrejo es dado vuelta apoyándolo sobre su región dorsal y sólo si el sujeto se reincorpora rápidamente recuperando su postura original son utilizados en el experimento. El fundamento para esta selección es que los sujetos con reacción lenta suelen morir pocos días después.

### **2.2.2 Protocolo experimental.**

El protocolo experimental típico incluye dos sesiones: la sesión de entrenamiento y la sesión de evaluación. La sesión de entrenamiento consiste en ensayos separados por un intervalo entre ensayos (IEE) (81,171 seg.). La sesión de evaluación consta de 2 o 6 ensayos (con IEE iguales a los del entrenamiento). Durante el intervalo entre sesiones los animales son ubicados en recipientes individuales con un fondo de agua de 0.5 cm. y guardados en cajones con una iluminación tenue.

Los cangrejos son distribuidos en pares de grupos, cada par consiste en un grupo entrenado (TR) y otro control (CT). El TR es entrenado de acuerdo al protocolo; y el CT, aún cuando permanece durante todo el tiempo de la sesión de entrenamiento en los actómetros, no se le presenta el estímulo.

Dado que el número de actómetros no resulta generalmente suficiente para correr simultáneamente todos los animales de cada experimento, se hacen necesarias replicaciones durante el mismo día. Se utiliza un número igual de animales por grupo en cada réplica, pero animales de un mismo grupo son ubicados en actómetros diferentes cada vez. De esta manera, cualquier efecto potencial del tiempo y/o diferencias entre los actómetros queda eliminado.

La línea de base del nivel de respuesta resulta consistente hasta los 10 días de llegados, pero animales provenientes de distintas capturas presentan diferencias en el nivel de respuesta cuyos factores se desconocen. Por ello, solo animales provenientes de la misma captura son utilizados en el mismo experimento.

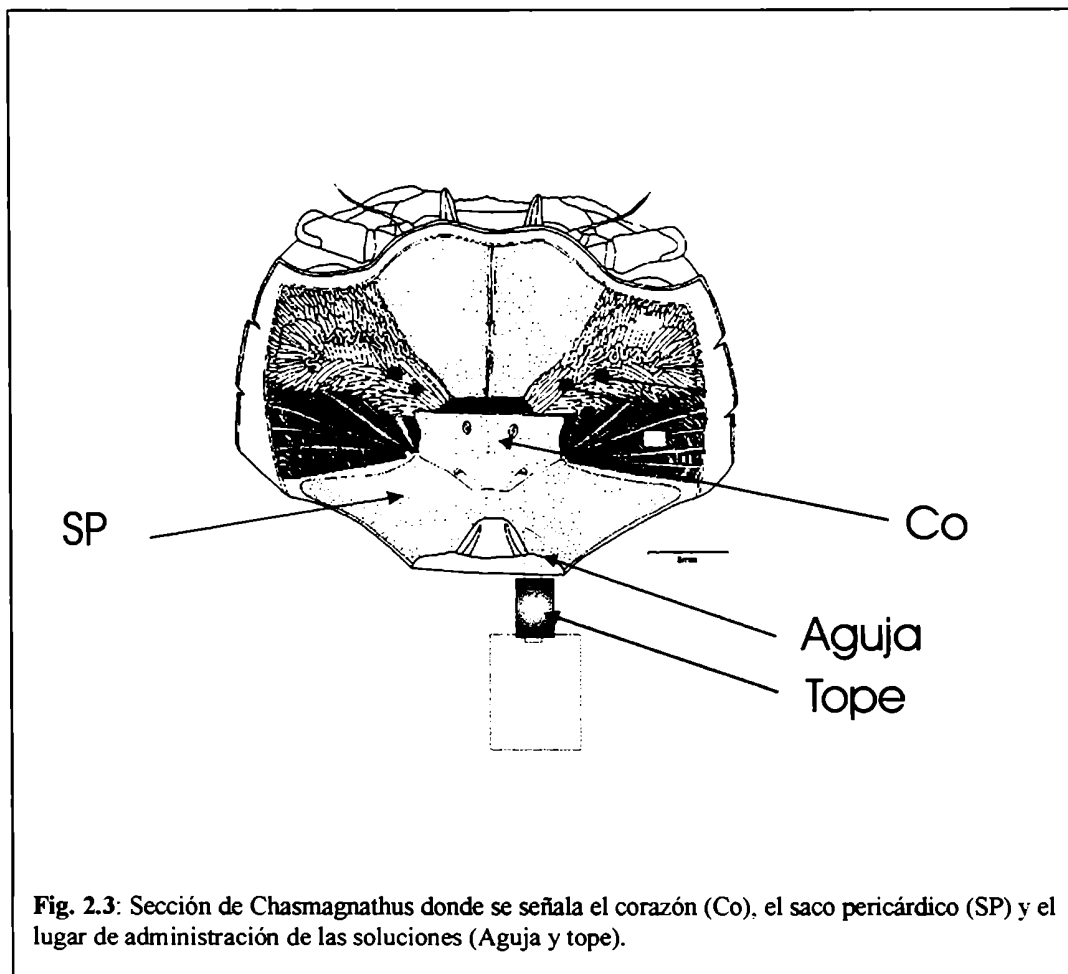
### **2.2.3 Entrenamiento fuerte y débil. Inyecciones.**

Un protocolo de **entrenamiento débil (PED)** consiste en la presentación de 5 o 10 ensayos (según se indica en cada experimento) con un intervalo entre ensayos de 180 seg. Un protocolo de **entrenamiento fuerte (PEF)** incluye 15 ensayos con un intervalo entre ensayos de 180 seg. o 30 ensayos con un intervalo de 90 seg. (según se indica en cada experimento). La sesión de evaluación consiste para ambos tipos de entrenamiento, en 2 o 6 ensayos con el mismo intervalo que se utiliza en el entrenamiento. Tanto la sesión de entrenamiento como la de evaluación es precedida por un período de adaptación de 15 min.

Para la administración de drogas se utiliza como vehículo 50  $\mu$ l de solución salina de crustáceos (Hoeger, 1989). Tanto la solución salina como las distintas drogas utilizadas son administrados a través del lado derecho de la membrana cefalotorácica-abdominal, con una penetración controlada de la aguja de 4 mm. Se asegura de esta forma que la solución es liberada en el

centro del saco pericárdico (Fig. 2.3). La inyección de vehículo no muestra tener un efecto propio sobre la reactividad.

Las inyecciones se administran inmediatamente antes, inmediatamente después o 1 h después del entrenamiento, según se indica en cada caso.



#### **2.2.4 Evaluación de la retención de la señal.**

La retención de la memoria de largo término es definida operacionalmente como la diferencia significativa entre los grupos CT y TR en el nivel de respuesta durante la sesión de evaluación. Es decir, para ponderar la memoria a largo término se focaliza el análisis de los datos en los niveles de respuesta de la evaluación. Rescorla (Rescorla, 1988) argumenta en forma

convinciente a favor de utilizar este tipo de análisis en vez de la comparación entrenamiento-evaluación, puntualizando la necesidad de distinguir entre el tiempo de adquisición de la información (sesión de entrenamiento) y tiempo de evaluación (sesión de evaluación). Un hecho que justifica este tipo de comparación es que el comportamiento del animal puede diferir entre las sesiones por razones no relacionados con el aprendizaje. Esta visión está especialmente justificada para nuestro modelo, considerando resultados previos demostrativos que la memoria contexto señal (MCS), antes llamada habituación de largo término, puede formarse independientemente del nivel de la respuesta de escape durante el entrenamiento (Tomsic, 1991). Un hallazgo coincidente con el de otras especies (Applewhite 1969, Peeke 1976).

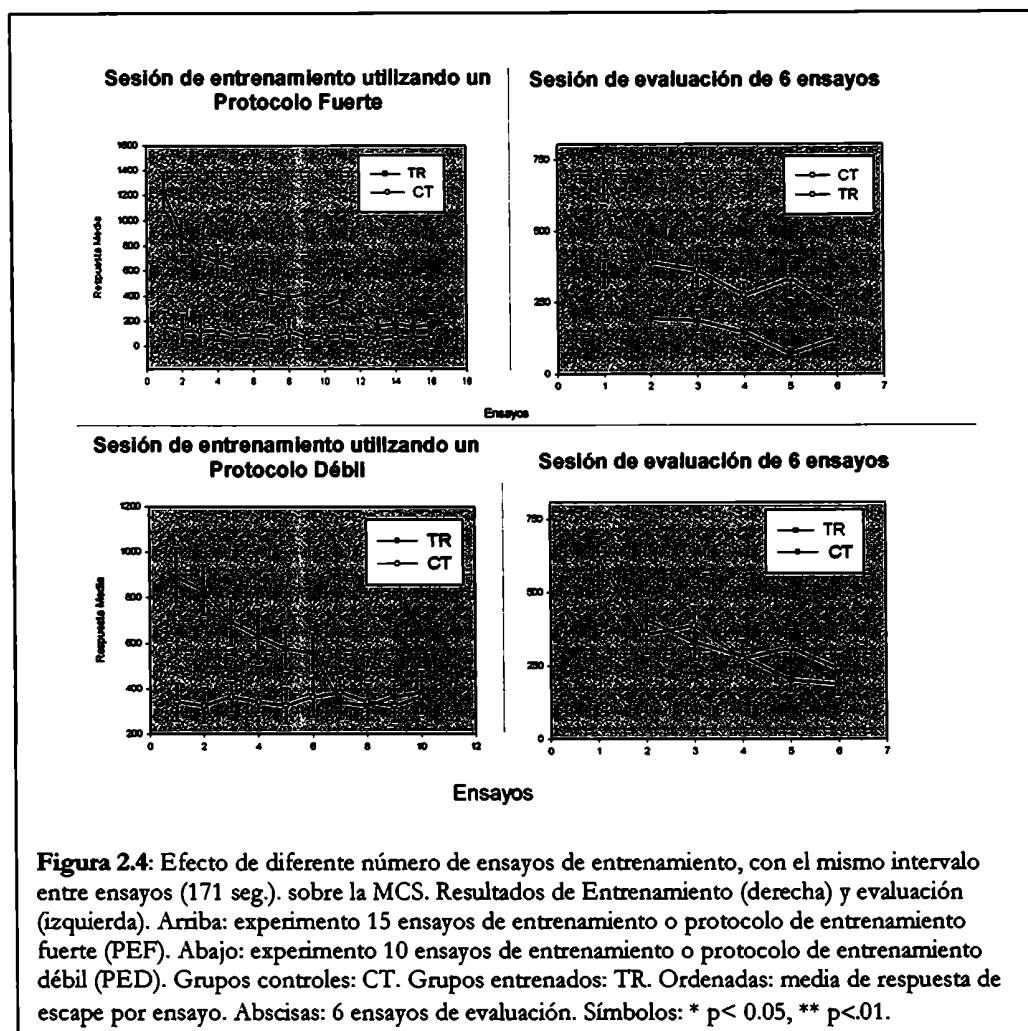
En los experimentos farmacológicos de esta Tesis, el análisis estadístico de los datos de la sesión de evaluación consiste en tres comparaciones planeadas: VEH-CT vs VEH-TR, X-CT vs X-TR y VEH-CT vs X-CT. Mediante estas comparaciones se pudo establecer la existencia de un efecto facilitador o amnésico de las drogas según se utilizara un protocolo de entrenamiento débil o fuerte, respectivamente. La aceptación del experimento está condicionada al hecho que la diferencia VEH-CT vs X-CT no sea significativa, es decir, de que haya un efecto inespecífico de la/s droga/s.

En algunos experimentos se incluyeron más de 4 grupos (N), y en tal caso se realizó N-1 comparaciones de cada uno de ellos vs VEH-CT, grupo que contenía el doble de animales.

El análisis de los datos de la sesión de evaluación se realiza considerando la suma de los valores de las respuestas individuales en los dos primeros ensayos. Este parámetro (bloque de dos ensayos de evaluación) resulta ser el más sensible para ponderar el efecto del entrenamiento, así como el efecto facilitador o amnésico de las drogas utilizadas. Los datos de la sesión de entrenamiento, en cambio, se evalúan mediante ANOVA de medidas repetidas.

Los gráficos de la Fig. 2.3 muestran ejemplos de protocolos de entrenamiento fuerte o débil, utilizados a lo largo de esta tesis para evaluar efectos amnésicos, o hipermnésicos de los agentes usados, respectivamente. El diseño experimental más utilizado es el siguiente. Un grupo de cangrejos se inyecta con solución salina (VEH) y otro con una de las drogas (X). La mitad de

los animales de cada grupo son entrenados (grupo -TR), mientras que la otra mitad permanecen en los actómetros pero sin recibir estimulación (grupo control- CT). De esta manera, cada experimento consiste de 4 grupos, dos pares de grupos VEH (VEH-CT y VEH-TR) y dos pares tratados con la droga, (X-CT, X-TR).



### 2.2.5 Definiciones.

Este conjunto de términos será de uso corriente a lo largo de esta Tesis:

- **Habitación a corto término (HCT)** es el decremento de la respuesta dentro de la sesión de entrenamiento.
- **Habitación a largo término (HLT)** es el decremento de la respuesta mantenido por al menos 24 h.



- **Memoria Contexto Señal (MCS)** es la memoria asociativa y de larga duración adquirida por entrenamiento espaciado. El término hace referencia al hecho que esta memoria se basa en una asociación entre el contexto (entorno experimental) y la señal (pantalla pasante, estímulo de peligro, estímulo fásico).
- **Memoria Señal (MS)** es la memoria no asociativa y de duración intermedia generada por entrenamiento masivo.
- **Intervalo entre ensayos (IEE)** se refiere al intervalo de reposo entre ensayos.
- La expresión **bloque de dos ensayos** se refiere a la suma por individuo del primero más el segundo ensayo de la sesión de evaluación.
- **Protocolo fuerte de entrenamiento (PEF)**: programa de entrenamiento que incluye 15-30 ensayos con IEE de 171 seg.
- **Protocolo débil de entrenamiento (PED)**: programa de entrenamiento que comprende 10 o menos ensayos con un IEE de 171 seg.
- **Contexto** define al conjunto de claves ambientales (visuales, táctiles) presentes en el lugar de entrenamiento ó en el de evaluación.

## 2.3 Análisis bioquímicos e inmunohistoquímicos

Los animales para los estudios de esta Sección fueron anestesiados en un baño de agua salobre a 4°C, sacrificados y el tejido en cuestión fue inmediatamente disecado.

### 2.3.1 Radioinmunoensayo (RIA).

Conjuntos de 10 cerebros, 5 ganglios torácicos y 4 branquias son procesados separadamente sumergiéndolos en ácido acético 2 M, hervidos durante 20 min. ,homogeneizados y centrifugados a 10.000 r.p.m. por 20 min. Los *pellet* se usaron para determinación de proteínas por el método de Lowry (Lowry, 1951). Los sobrenadantes se liofilizaron y resuspendieron en *buffer* de radioinmunoensayo. Se utiliza un radioinmunoensayo para determinación de

Angiotensina II (ANGII) desarrollado en el Depto. de Sustancias Vasoactivas del IIM "A. Lanari". El anticuerpo anti-ANGII se obtuvo en conejos albinos de Nueva Zelandia inmunizados con Angiotensina II acoplada a BSA, usando la reacción de Glutaraldehído (25% w/v).  $^{125}\text{I}$ -All se preparada por el método de cloramina-T utilizando 17 Ci/mg de  $^{125}\text{I}$  (Nez-033L Dupont, Argentina) (Greenwood, 1963). La purificación de  $^{125}\text{I}$ -ANGII y la identificación de inmunorreactividad similar a ANGII se realiza por HPLC utilizando 0,1 M de trietilamina/HCOOH, pH 3 como fase móvil y Li Chrosfere RP-8, 5- $\mu\text{m}$  (Merck, EEUU) como columna. Después de la inyección, se programa un gradiente lineal de metanol de 0 a 100% durante 40 min., más un paso adicional de 10 en metanol, flujo: 1ml/min, fracciones: 1ml/min; determinación de radioactividad por contador Gamma.

Para evaluar inmunorreactividad similar a ANGII las fracciones son liofilizadas, lavadas con metanol, secadas y resuspendidas en *buffer* de radioinmunoensayo (0,05 M  $\text{NaPO}_4\text{H}_2$ , 0,1 % BSA, 0,3 mM azida sódica, 0,1 mM EDTA e inhibidores de proteasas, pH 7,4). El radioinmunoensayo se lleva a cabo con 100  $\mu\text{l}$  de radioligando (7.000-10.000 c.p.m.) 100  $\mu\text{l}$  de *standard* (ANGII humana, Sigma, 3.5-1.000 pg) o muestra y 100  $\mu\text{l}$  de anticuerpo (1/9000), incubado a 4 °C en buffer de radioinmunoensayo durante 12 horas. El radioligando libre se precipita con carbón dextrano T-70 y se determina la radiactividad. Todos los reactivos fueron provistos por Sigma Co. excepto los indicados. El anticuerpo usado presenta reactividad del 0.1% con Angiotensina I, 150% con Angiotensina III, 100% con ANGIV, 1% con Ile5-ANGIV y menores al 0.5% con BSA, FSH y TRH.

### 2.3.2 Medición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

Los ensayos bioquímicos para evaluar la actividad de ECA se llevaron a cabo en extractos crudos. La actividad se evalúa por el método de Friedland y Silverstein (Friedland, 1976). Los tejidos son homogeneizados en PBS a PH 8.3, y centrifugados 5 min. a 1000 r.p.m. El contenido de proteínas de los extractos se estima por el método de Lowry (Lowry, 1951).

Cada muestra de extracto crudo (10 $\mu$ l) se agrega a 100  $\mu$ l de *buffer* (Hipuril-L-Histidil-L-Leucina en PBS) y se incuba a 37°C por 120 min. La reacción se detiene con 1 ml de 0,4 M de HClO<sub>4</sub> y se centrifuga 15 min. a 2.500 r.p.m. A 50  $\mu$ l del sobrenadante se agrega 5  $\mu$ l 0.38M NaHO seguido por 25  $\mu$ l de 2% o-ftalaldehido en metanol y, luego de 10 min., por 30  $\mu$ l de 2,5 M PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub>. La fluorescencia se determina en un espectrofluorómetro a 360/500 nm. La actividad de la enzima se expresa en nmol de L-Histidil-Leucina liberada por mg de proteína por hora. La concentración de proteínas se estima por Lowry.

### **2.3.3 Inmunohistoquímica.**

El ganglio supraesofágico y los pedúnculos son disecados, fijados (PBS, 4% paraformaldehido) durante 12 horas a 4 C°. y, luego, colocados durante 12 h en PBS-25% sucrosa; congelados y cortados en secciones de 20-25  $\mu$ m en crióstato a -20 C°. Las secciones son pre-incubadas en PBS, 0.5% BSA y 0.25% Tritón X-100 y procesadas usando el kit comercial Vectastain ABC Elite (Vector), según las normas del fabricante, para una técnica basada en peroxidasa avidina-biotina. Para el revelado se usa diaminobencidina (0.03% en Tris 0.1M, Ph 7.6). A lo largo de esta serie de experimentos, se suprime el uso de agua oxigenada ya que no es necesario eliminar la actividad de peroxidasas endógenas y la antigenicidad en el tejido se mantiene notoriamente más alta (esta serie de trabajos inmunohistoquímicos fueron puesto a punto conjuntamente con el Dr. D. Nässel, Universidad de Estocolmo, Suecia).

La dilución de los anticuerpos es de 1:500 a 1:1000 en PBS-0.5% BSA-0.25% TX-100 y la incubación por 48hs. a 4° C. Se usan dos anticuerpos, el anticuerpo descrito en la sección Radioinmunoensayo y otro comercialmente disponible (Pensisula Lab., USA) contra ANGII humana.

Para los controles de preabsorción se usa antisuero preincubado durante 12 h a 4 C° con 50 uM de ANGII humana. La omisión del anticuerpo primario es usada como control de rutina.

### **Capítulo 3**

## **Resultados**

**Evidencias bioquímicas de la presencia  
del sistema de las angiotensinas en el  
SNC de Chasmagnathus.**

### **3.1 Inmunorreactividad similar a angiotensina II y actividad similar a enzima convertidora de Angiotensina.**

Con el fin de investigar la presencia de un sistema de angiotensinas endógeno en el cangrejo, se estimó la inmunorreactividad similar a angiotensina por RIA.

Cantidades significativas ( $\eta$ g/mg de proteína) se encontraron en muestras consistentes de 10 ganglios supraesofágicos, 5 torácicos o 10 branquias (Tabla 3.1). Cerca del 30% de la inmunorreactividad encontrada en el ganglio torácico, coeluye con ANGII humana en un ensayo que combina HPLC (usando el mismo tipo de corrida que la descrita para separar el péptido iodinado) y RIA (Fig. 3.1).

**Tabla 3.1**

TEJIDO	CONTENIDO ESTIMADO $\eta$ g/mg prot.
Ganglio torácico	0.47 +/- 0.08, n=3
Ganglio supraesofágico	2.88 +/- 1.2, n=3
Branquias	0.778 +/- 0.26, n=3

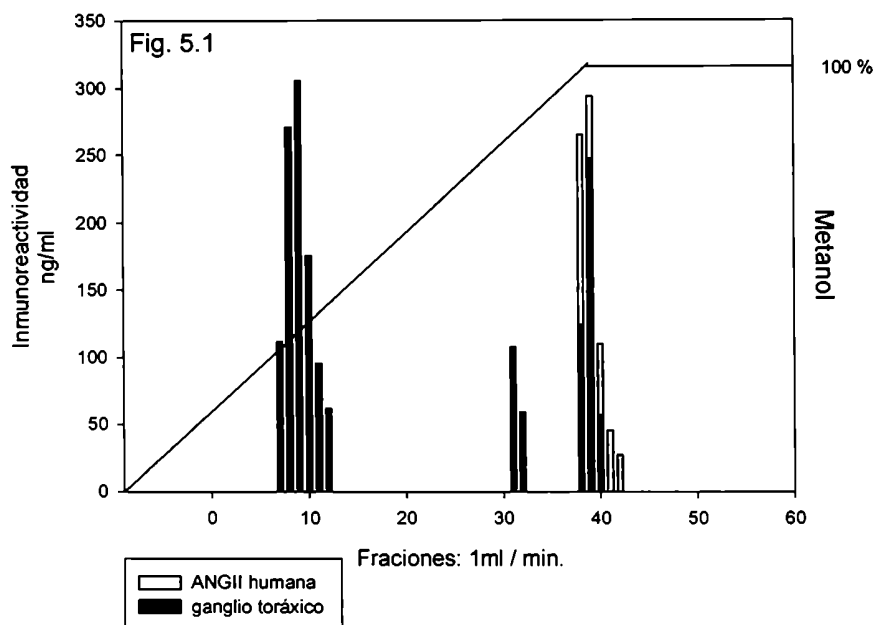


Fig. 3.1 Separación por HPLC de inmunorreactividad similar a ANGII de homogenato de ganglios torácicos. Ordenadas derecha: inmunorreactividad; izquierda: % de metanol.

La actividad enzimática similar a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de homogenatos, fue evaluada en ganglio torácico y branquias. Se encontró una actividad hidrolítica significativa de Hippuril-Hys-Leu (nmol/h/mg de proteínas) que fue inhibida por 5mM de EDTA y por 1  $\mu$ M de captopril, un inhibidor de ECA para mamíferos ampliamente usado, sugiriendo así que esta actividad enzimática corresponde a ECA (Smiley, 1994).

Tejido	Actividad hidrolítica (nmol/h/mg de proteínas) de Hippuril-Hys-Leu	Más 5mM EDTA	Más 1 $\mu$ M captopril
Ganglio torácico	2108 +/- 305	362 +/-128	638 +/- 219
Branquias	2200 +/- 359	430 +/-118	161 +/- 92

### 3.2 Distribución de inmunorreactividad similar a angiotensina II en el sistema nervioso central de Chasmagnathus.

Los dos antisueros contra ANGII produjeron inmunomarca muy similar en el sistema nervioso de *Chasmagnathus*. No se detectó marca cuando los antisueros usados fueron pre-absorbidos con el ANGII humana (50 nmol de

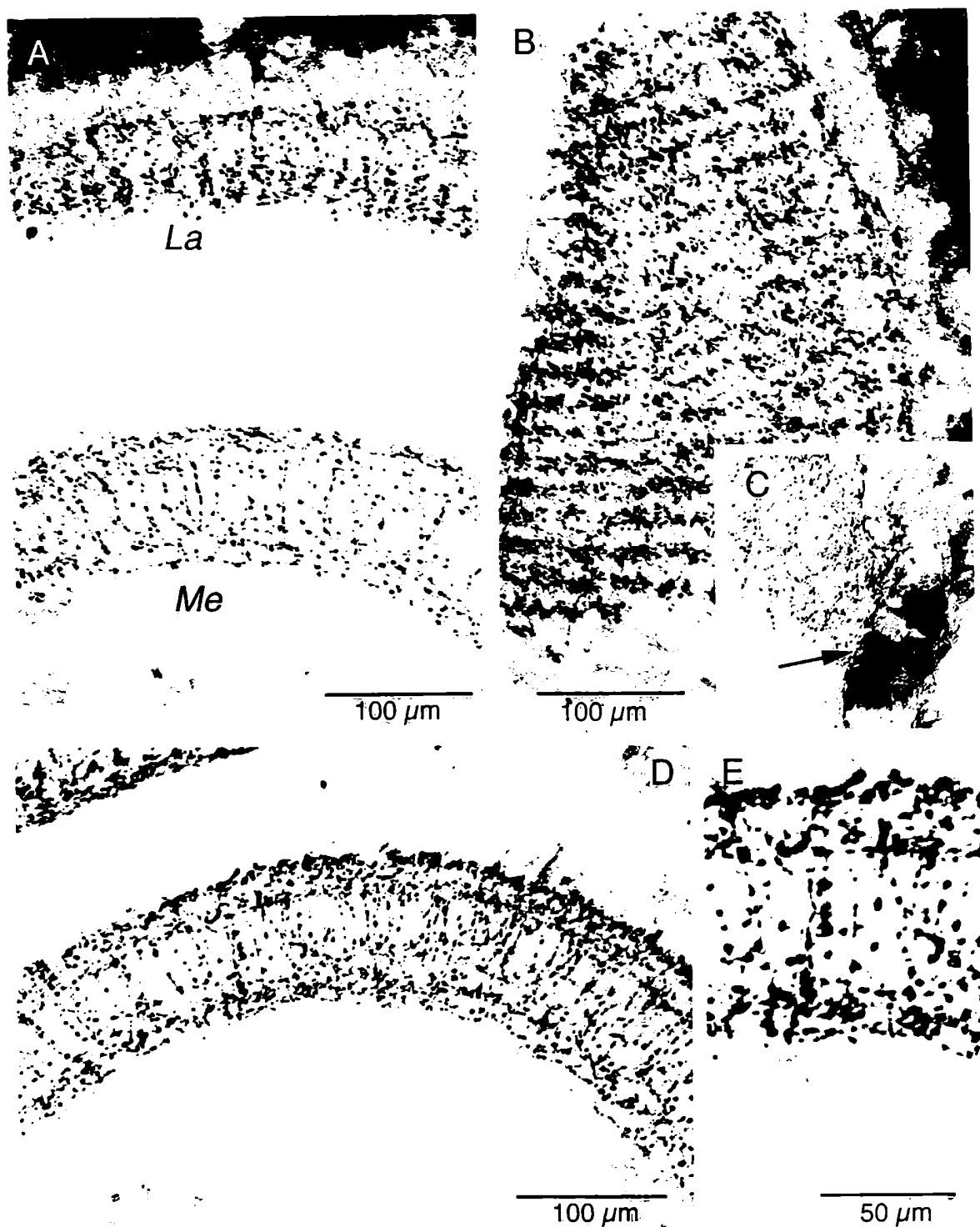
peptido por ml de antisuero) o después de la omisión de los antisueros primarios. Es importante notar aquí que alrededor del 30% del material inmunoreactivo (según lo medido por RIA) coeluye en HPLC con el mismo tiempo de retención que ANGII (Fig. 3.1).

El cerebro de *Chasmagnathus*, como el de otros crustáceos decápodos, abarca dos divisiones principales, el ganglio supraesofágico y los dos lóbulos ópticos laterales situados en los pedúnculos. Estos últimos tienen, como se ha descrito en la Introducción, cuatro neuropilos ópticos, lámina (La), médula externa (Me), médula interna (Mi) y médula terminalis (Mt). Las células del órgano neuroendocrino MTXO se encuentran en la Mt. Ubicada entre estos dos últimos neuropilos se halla el órgano neurohemal llamado glándula del seno (GS).

Pericardios de neuronas con inmunorreactividad similar a ANG II fueron detectadas en la base anterior de la La. Estos cuerpos conectan, a través de extensos procesos la La y Me. Las varicosidades de estos procesos invaden todas las unidades sinápticas con forma de columnas en la La (Fig.3.2 A, B, C, D). Este tipo de neurona no se ha descrito previamente en crustáceos (Nässel, 1977). En la glándula del seno pudo observarse abundante inmunomarca (Fig. 3.3 A,B), sugiriendo un papel de neurohormona para este péptido.

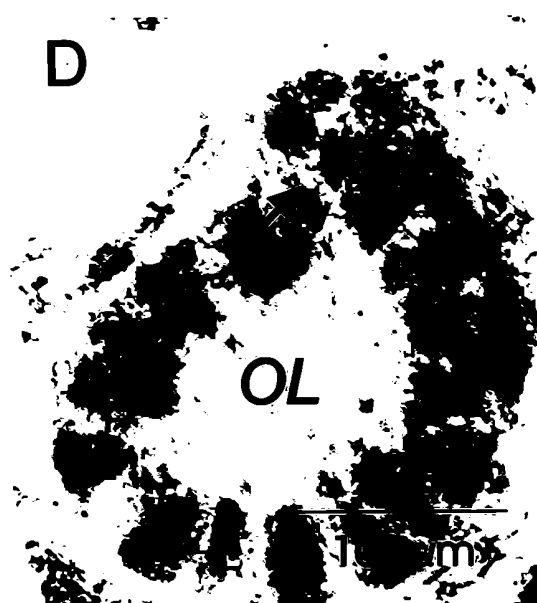
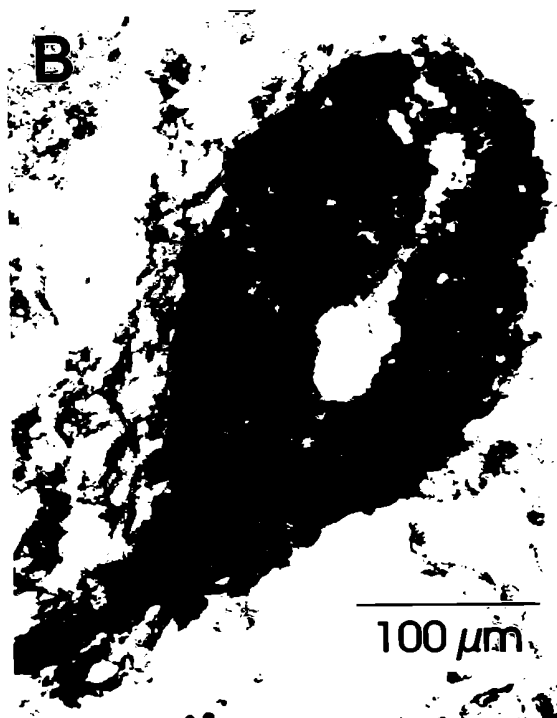
La detección de material reactivo en el ganglio supraesofágico fue menos conspicua. Inmunomarca de secciones con ambos antisueros contra ANG II mostró procesos neuronales en los bordes de los neuropilos protocerebrales anteromediales (AMPO) (fig. 3.3 C) y lóbulos olfatorios (fig. 3.3 D).

Estos resultados apoyan la idea de que péptidos similares a ANGII se encuentran en neuronas del sistema nervioso central de *Chasmagnathus*. Asimismo, los resultados del presente capítulo constituyen la primera evidencia de la presencia de angiotensinas en todo el phylum de artrópodos, teniendo en cuenta que si bien en insectos se había definido actividad similar a enzima convertidora de angiotensina, esta enzima tiene actividad sobre múltiples sustratos (Introducción, 1.9.7). Luego de presentar los resultados pertenecientes a los próximos capítulos (Capítulos 3 y 4), discutiremos los resultados del presente capítulo desde un aspecto funcional (Discusión, 6.1)



**Figura 3.2** Microfotografías de lóbulos ópticos mostrando inmunoreactividad similar a ANG II. A: inmunoreactividad similar a ANG II en las capas más externas de los lóbulos ópticos (médula externa, Me, y lamina ganglionaris, La). B: Varicosidades invadiendo todas las unidades sinápticas en la La, C: Pericardias de neuronas inmunoreactivas para ANG II en la base anterior de la médula externa (Me). A, B C, usando un anticuerpo contra ANG II humana desarrollado por le Dr. C.J. Pirola, "I.I.M. A. Lañari", U.B.A. D: Sección de la Me con abundante material inmunoreactivo revelado con un anticuerpo comercial contra ANG II humana, Península Co, USA. E: Detalle de los neuropilos de la Me.





**Figure 3.3.** A, B: Prominente material inmunorreactivo similar a ANGII en la glándula del seno (sg), Mt: médula terminalis, B: Detalle de sg. C: Procesos neuronales inmunorreactivos en los neuropilos protocerebrales anteromediales (AMPO). D: material inmunorreactivo en neuropilos columnares del lóbulo olfatorio (OL).

## Capítulo 4

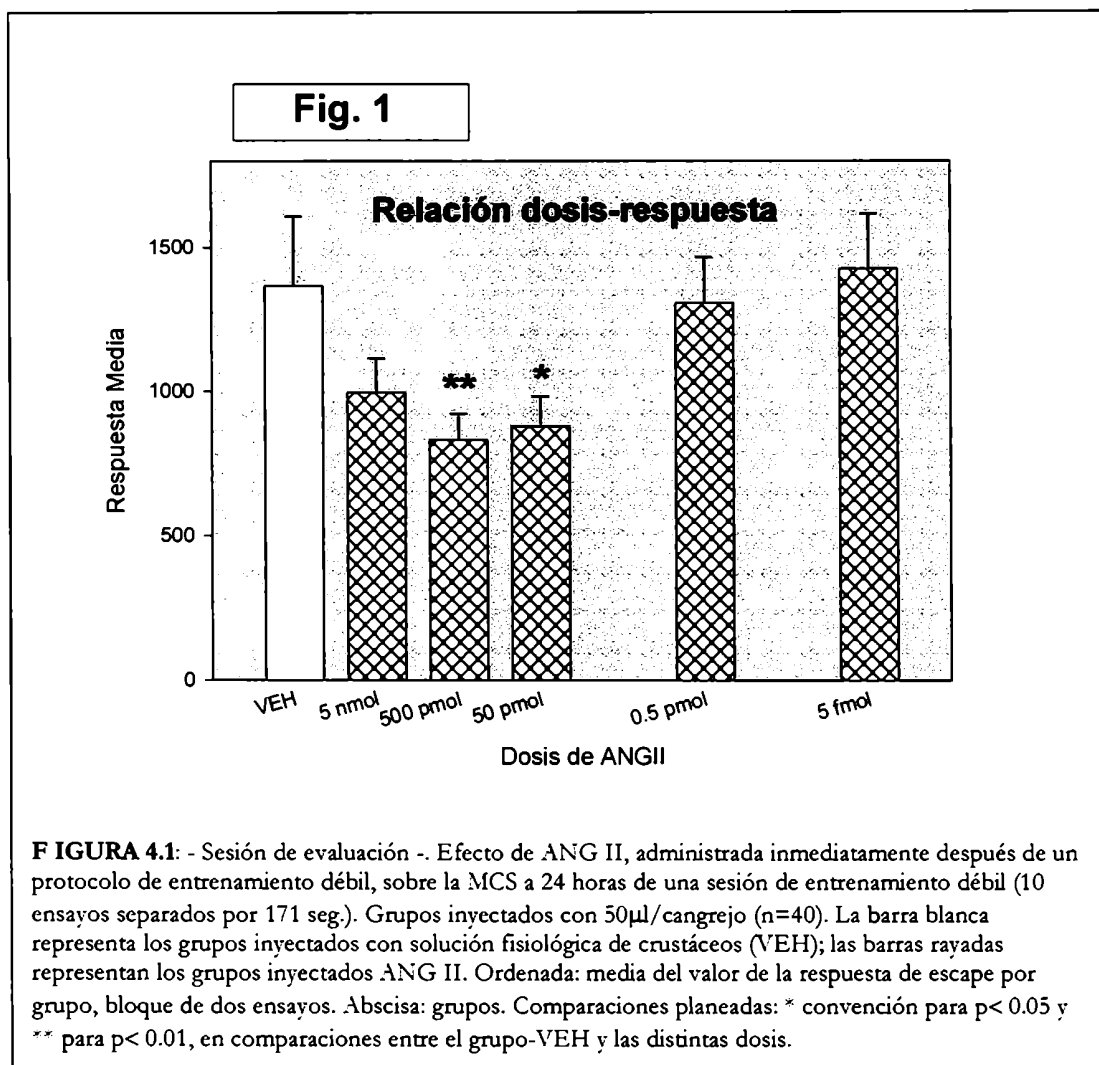
# Farmacología de las angiotensinas sobre la Memoria Contexto Señal en *Chasmagnathus*

#### 4.1 En busca de un efecto facilitador sobre la memoria: una curva dosis-respuesta con ANGII inyectada luego de un protocolo de entrenamiento débil de 10 ensayos.

Los datos bibliográficos en vertebrados muestran que ANG II presenta tanto efectos amnésicos como hipermnésicos, dependiendo de las condiciones experimentales (Introducción 1.9.8).

Las primeras aproximaciones experimentales de esta Tesis fueron realizadas para evaluar si ANG II tenía efectos amnésicos sobre la Memoria Contexto Señal (MCS) de *Chasmagnathus*, para lo que se utilizaron protocolos de entrenamiento fuerte. Todos los resultados fueron negativos aún usando dosis muy altas del péptido (5 nmol / animal). Considerando estos resultados y los datos bibliográficos que mostraban a ANG II como un neuropéptido facilitador, nos propusimos evaluar la hipótesis que ANGII mejora la MCS. Comenzamos probando el efecto de diversas dosis de ANG II utilizando un protocolo de entrenamiento débil. Se conformaron seis grupos de animales (n=26) a los que se inyectó, inmediatamente luego de la sesión de entrenamiento débil (10 ensayos), solución fisiológica de crustáceos (VEH) o diversas dosis de ANG II, a saber: 5 nmol; 500, 50, y 0.5 pmol; y 5 fmol /animal.

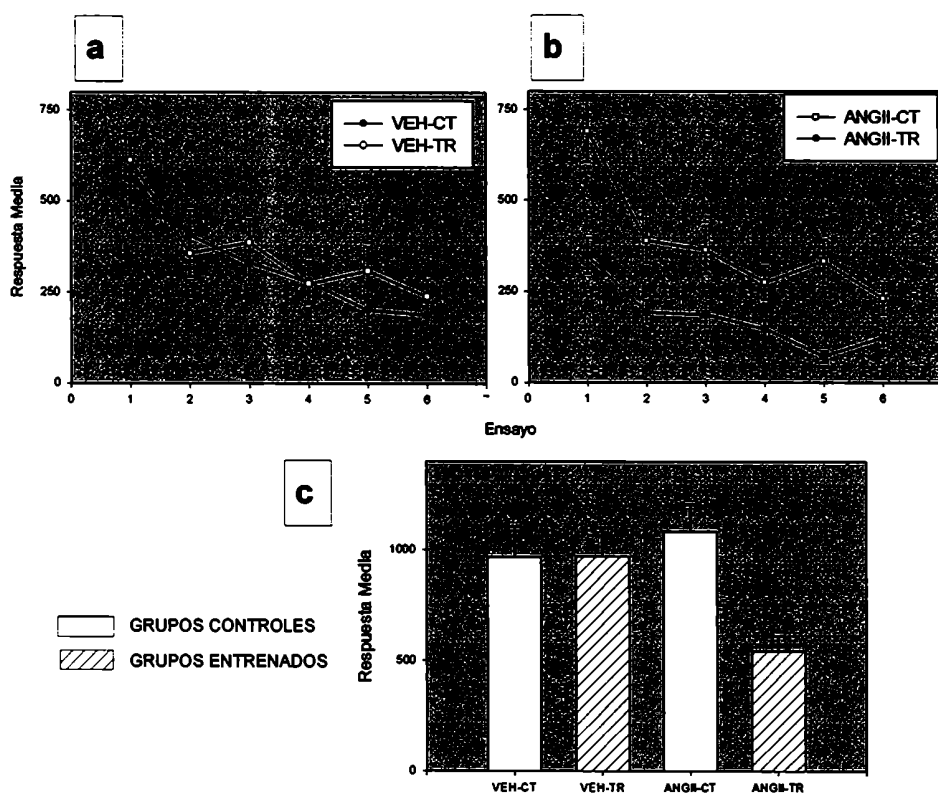
La relación dosis-respuesta durante la sesión de evaluación (bloque de dos ensayos), 24 h luego del protocolo de entrenamiento débil, se muestra en la fig. 4.1. Esta relación en forma de U, frecuentemente observada en estudios sobre efectos mnésicos de muchos neuropéptidos (De Wied, 1997). Los grupos tratados con ANGII en dosis de 50 y 500 pmol/animal mostraron diferencias con el grupo de animales inyectados con vehículo [ $F(1,194) = 6.92$ ,  $p < 0.05$  y  $F(1,194) = 7.68$ ,  $p < 0.01$ ].



La posibilidad que el resultado anterior pueda ser explicado por efectos inespecíficos, fue explorada en la siguiente serie de experimentos. Un grupo de cangrejos fue entrenado con un protocolo de entrenamiento débil de 10 ensayos (TR), mientras otro grupo permaneció en los actómetros sin estimulación (CT). La mitad de los animales de cada grupo se inyectó con solución salina (VEH) y la otra con ANG II (50pmol) (denominados ANGII), ambos inmediatamente después del entrenamiento, conformándose así cuatro grupos (n=40):

VEH-CT	vehículo-control
VEH-TR	vehículo-entrenado
ANGII-CT	ANG II 50pmol-control
ANGII-TR	ANG II 50pmol-entrenado

Veinticuatro horas luego del entrenamiento, los animales tuvieron 6 ensayos de evaluación con el mismo intervalo entre ensayos (IEE) del entrenamiento (171 seg.). La Fig. 4.2 (a y b) ilustra la respuesta durante los seis ensayos de evaluación. Como se esperaba, no se encontraron diferencias entre el par de grupos VEH-CT y VEH-TR (Fig. 4.2a), pero se reveló una diferencia significativa entre ANG II-CT y ANG II-TR, tanto en el primer ensayo [ $F(1,156)= 11.11$ ,  $p<0.025$ ], así como en la mayoría del resto de los ensayos (Fig. 4.2b). No se exhibió ninguna diferencia entre los grupos de control (es decir, VEH-CT vs ANGII-CT) durante la sesión de evaluación, un resultado recurrente durante toda esta Tesis y que se conforma con el criterio usado para aceptar la viabilidad de un experimento (Capítulo 2.2.4).



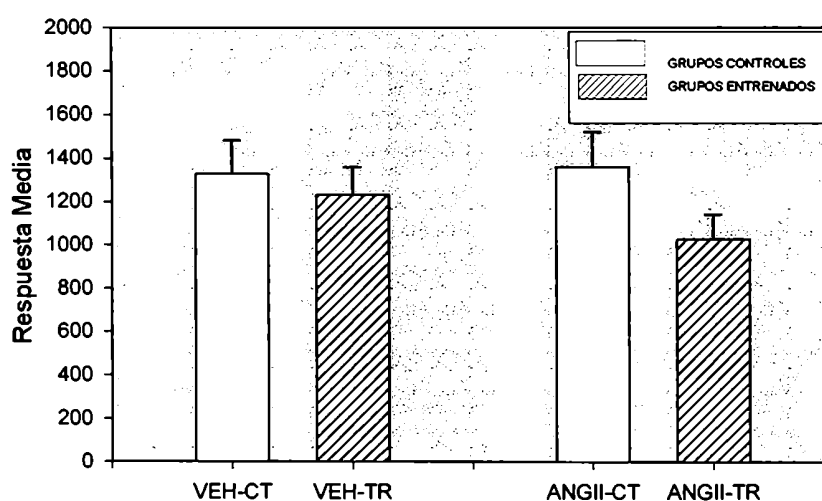
**FIGURA 4.2:** - Sesión de evaluación - Efecto de ANG II, administrada inmediatamente después de un protocolo de entrenamiento débil (10 ensayos separados por 171 seg.), sobre la MCS evaluada 24 horas luego de la sesión de entrenamiento. Animales inyectados con solución fisiológica de crustáceos (VEH) y con 50 pmol de ANG II (ANGII). Grupos inyectados con solución fisiológica de crustáceos (VEH) y con 50 pmol de ANG II (ANGII). Grupos controles (CT) y entrenados (TR). **a)** grupos inyectados con vehículo. **b)** grupos inyectados con 50 pmol de ANG II. **c)** resultados presentados en el bloque de los dos primeros ensayos de la sesión de evaluación.  $n= 40$  por grupo. Ordenadas: media del valor de la respuesta de escape por grupo. Comparaciones planeadas: \* convención para  $p< 0.05$  y \*\* para  $p< 0.01$ .

En la Fig. 4.2.c. se muestran los resultados de la sesión de evaluación, Fig.4.2. a y b, pero confinados al bloque de los dos primeros ensayos; forma que se usará sistemáticamente a lo largo de la Tesis. Se considera que a través del uso del bloque de los dos primeros ensayos se puede evaluar fielmente los niveles de retención de la MCS.

#### 4.2 ANG II facilita la retención cuando es inyectada luego del entrenamiento débil de 10 ensayos, pero no luego de 5 ensayos.

El propósito del siguiente experimento fue explorar si un número aún menor de ensayos, cinco en lugar de diez, es suficiente para poder revelar efectos facilitadores de ANG II. El experimento se hizo de la misma manera que el anterior, salvo que sólo hubo 5 ensayos de entrenamiento.

Los resultados de la sesión de evaluación se ilustran en la Fig. 4.3 (bloque de 2 ensayos). A diferencia del experimento anterior no se pudo demostrar efecto facilitador cuando se inyectó ANG II post-entrenamiento. Este experimento fue replicado dos veces con resultados similares, i.e. la diferencia entre ANGII-CT y ANGII-TR no alcanza el nivel de significancia. Por lo tanto, ANG II (50 pmol) tiene efecto facilitador sobre la MCS cuando se inyecta luego de un protocolo de diez ensayos de entrenamiento pero no luego de cinco.



**FIGURA 4.3:** - Sesión de evaluación - Efecto de ANG II, administrada inmediatamente después de un protocolo de entrenamiento débil (5 ensayos separados por 171 seg.), sobre la MCS evaluada 24 horas luego de la sesión de entrenamiento. Animales inyectados con solución fisiológica de crustáceos (VEH) y con 50 pmol de ANG II (ANGII). Sesión de evaluación de 2 ensayos. Grupos controles (CT) y entrenados (TR). Ordenadas: media del valor de la respuesta de escape por grupo en el bloque de dos ensayos. Comparaciones planeadas: \* convención para  $p < 0.05$  y \*\* para  $p < 0.01$ , en comparaciones entre el grupo CT vs TR.

### 4.3 ANG II facilita la MCS cuando es inyectada inmediatamente luego del entrenamiento débil, pero no cuando es administrada antes o una hora después del entrenamiento.

Los experimentos en esta sección fueron diseñados para explorar la ventana temporal de la acción de ANG II en la MCS, cuando los animales experimentan un protocolo de entrenamiento débil de 10 ensayos. Cada experimento incluyó los grupos VEH-CT, VEH-TR, ANGII-CT y ANGII-TR, con administración de vehículo o soluciones del péptido, como en los anteriores experimentos.

Los grupos ANG II fueron inyectados (50 pmol/animal) antes del primer ensayo del entrenamiento (primer experimento,  $n=35$ ), inmediatamente después del último ensayo (segundo experimento,  $n=35$ ), o una hora luego del entrenamiento (tercer experimento,  $n=40$ ). Todos los animales provienen de una misma captura.

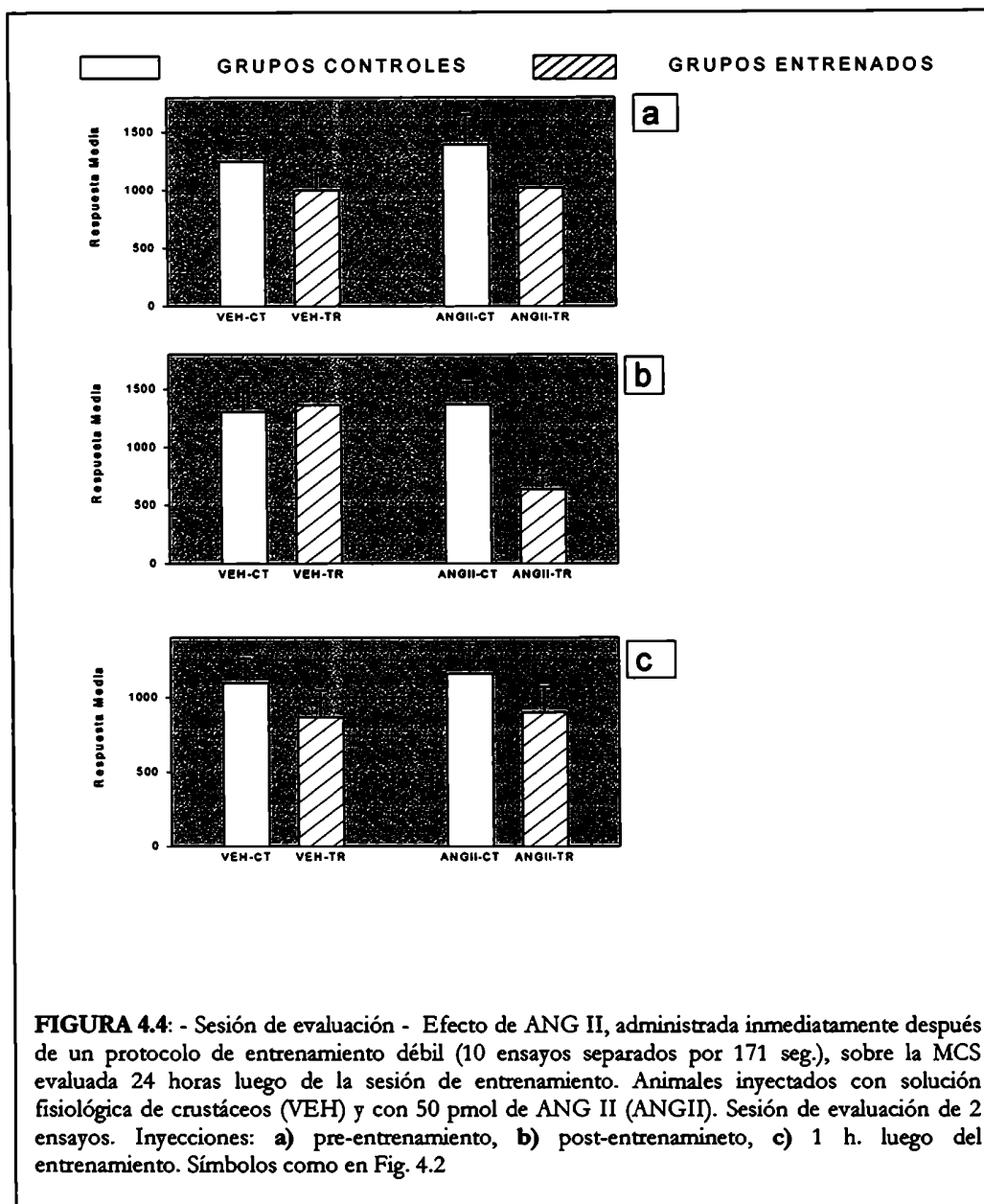
La Fig. 4.4 muestra los resultados de sesiones de evaluación correspondientes a los tres experimentos. Cuando los animales fueron inyectados inmediatamente antes del entrenamiento no hubo efecto de ANG II (Fig. 4.4a). Las comparaciones planeadas no revelaron diferencia significativa en ningún ensayo tanto para VEH-CT contra VEH-TR como para ANGII-CT contra ANGII-TR.

Los resultados obtenidos con los cangrejos inyectados inmediatamente después del entrenamiento (Fig. 4.4b) resultaron consistentes con los experimentos anteriores: ANG II tuvo un evidente efecto facilitador sobre la MCS. No hubo diferencias significativas entre VEH-CT y VEH-TR pero sí para el contraste ANGII-CT vs. ANGII-TR (panel derecho) en el bloque de los dos primeros ensayos de evaluación [ $F(1,136)=7.17$ ,  $p<0.05$ ].

Cuando ANG II fue administrada 1 h después del último ensayo del entrenamiento no se detectó efecto alguno sobre la retención (FIG 4.4c). Así, la ventana temporal para el efecto de administración de ANG II en la retención parece ser menor a 1 h después del último ensayo.

Estos resultados son relevantes con relación a la hipótesis que las angiotensinas son facilitadoras de la MCS. En efecto, un requisito para que un agente endógeno pueda ser considerado con acción mnésica (i.e. amnésico o

hipermnésico), es que los efectos de su administración exógena sean tiempo-dependientes (De Wied, 1997). Como se señaló en la Introducción (Introducción, 1.4.3), ésta tiempo dependencia resulta ser uno de los más importantes argumentos a favor de la existencia de un proceso de

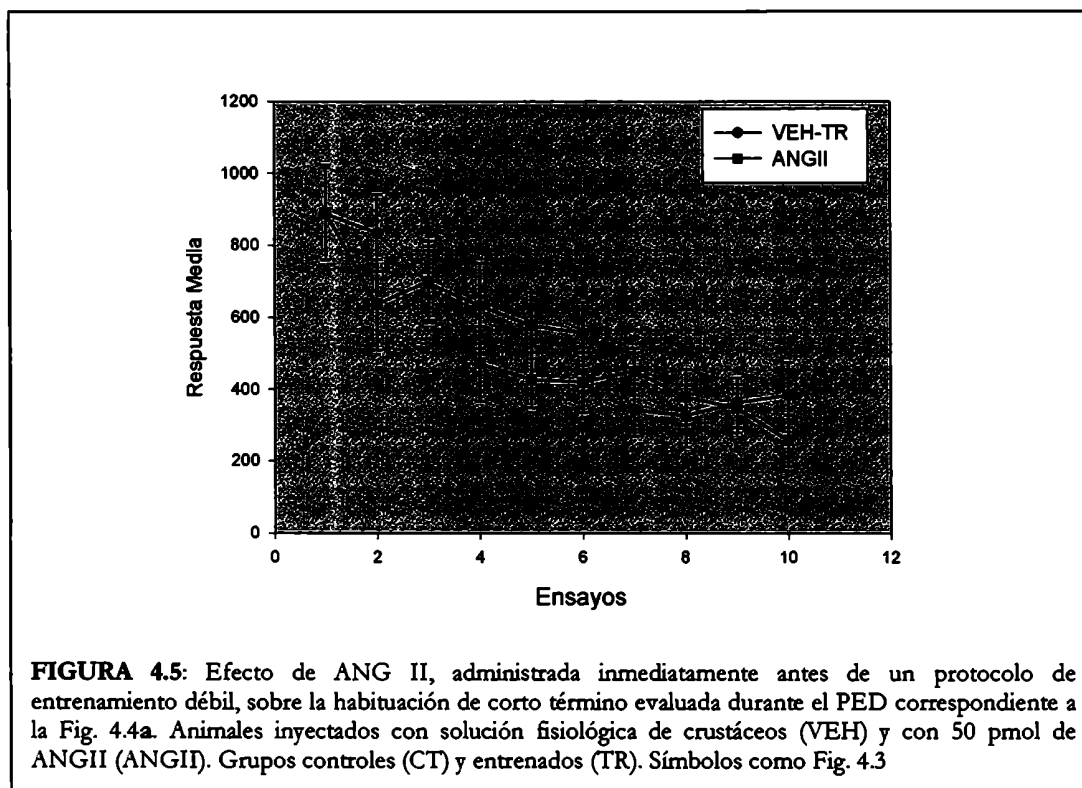


consolidación de la memoria.

Es digno observar que la inyección de ANGII antes del entrenamiento (primer experimento) no parece tener ningún efecto en la habituación a corto término. Un ANOVA 2 x 10 mostró que ni el efecto de la droga ni la interacción



de la droga x ensayo fueron significativos, pero sí resultó significativo el efecto ensayo [ $F(1,612)=19.35$ ,  $p<0.01$ ] (Fig. 4.5).



#### 4.4 El efecto facilitador de ANG II sobre la MCS es abolido cuando es co-administrada con Saralasina.

Con el fin de explorar si el efecto facilitador de ANG II sobre la MCS en *Chasmagnathus* está mediado por los receptores de angiotensina II, el antagonista saralasina (SAR) (Sigma, USA), que actúa sobre todos los subtipos de receptores de ANG II en varios vertebrados (Timmermans, 1993), fue utilizado. Se formaron cuatro pares de grupos CT-TR:

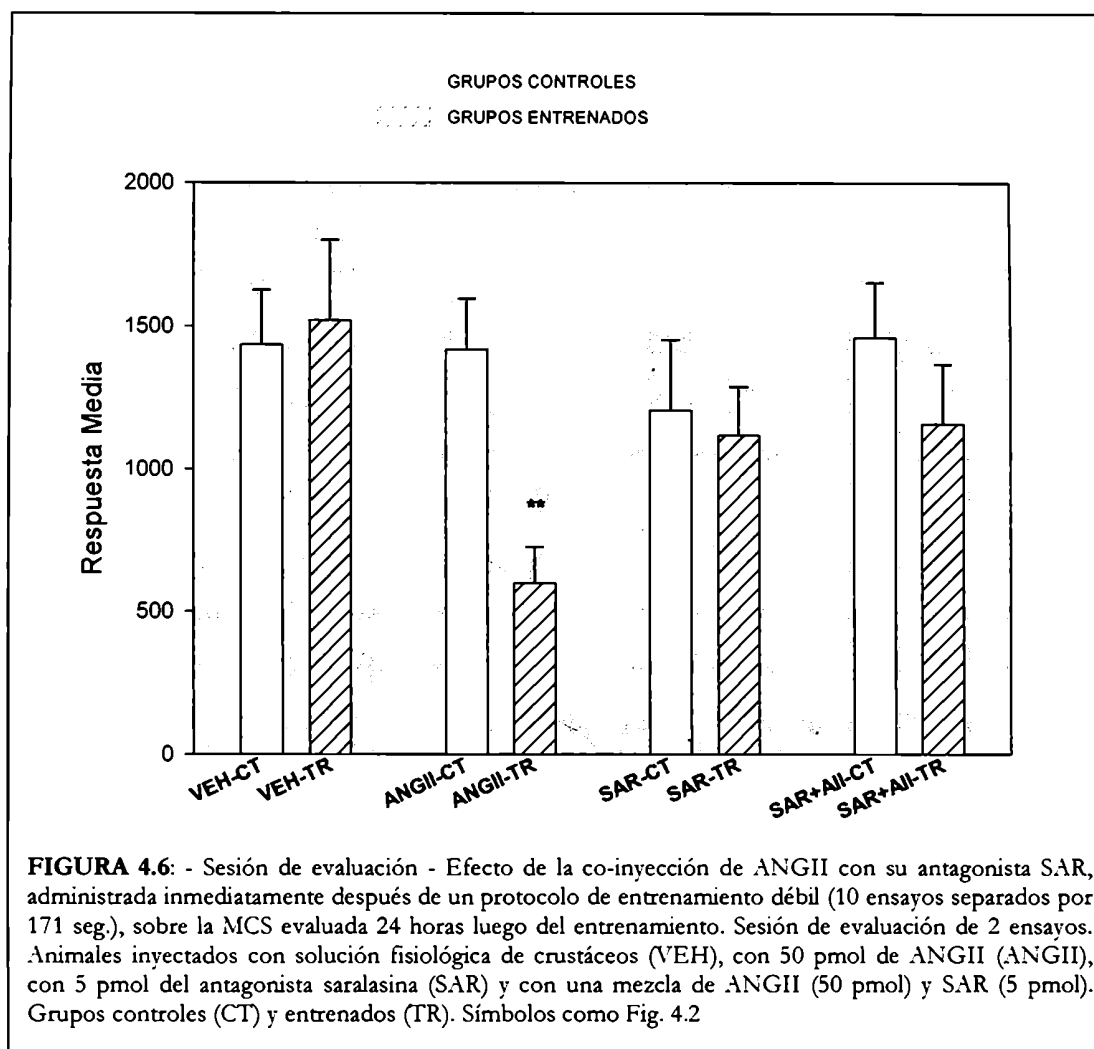
VEH-CT	Vehículo-control
VEH-TR	Vehículo-entrenado
ANGII-CT	ANG II 50pmol-control

ANGII-TR	ANG II 50pmol-entrenado
SAR-CT	SAR 5pmol-control
SAR-TR	SAR 5pmol-entrenado
ANGII+SAR-CT	SAR 5pmol+ANG II 50pmol-control
ANGII+SAR-TR	SAR 5pmol+ANG II 50pmol-entrenado

Los animales (n=39 por grupo) experimentaron un protocolo de entrenamiento débil (10 ensayos) y una sesión de evaluación de 2 ensayos, 24 h después del entrenamiento. Las inyecciones se administraron inmediatamente después de la sesión del entrenamiento.

Los resultados de la evaluación se exhiben en la Fig. 4.6. Las comparaciones planeadas no mostraron ninguna diferencia significativa entre grupos de cualquier par, excepto entre grupos ANG II, los que mostraron diferencia significativa en el bloque de 2 ensayos [ $F(1,152) = 9,1$   $p<0.01$ ]. Las comparaciones entre los grupos control no mostraron diferencias significativas. Una réplica de este experimento, más otro donde se administró 50 pmol, en lugar de 5 pmol, del antagonista SAR, confirmaron estos resultados (datos no presentados).

Así, la capacidad de ANGII de favorecer la retención a largo plazo, es decir, de inducir diferencia significativa entre grupo controla y entrenado durante la sesión de evaluación, es suprimida por la co-inyección con SAR. Esto no se podría explicar por un efecto inespecífico de SAR en el nivel de la respuesta, ya que no se encontró diferencia significativa entre los grupos controles.



**4.5 El antagonista de ANGII, SAR, produce un efecto amnésico cuando es inyectado inmediatamente antes o después del entrenamiento, pero no una hora después del mismo.**

Los resultados precedentes indicaron que la administración luego de un protocolo de entrenamiento débil del antagonista saralasina, no tiene efecto por sí sobre el nivel de la respuesta durante la sesión de evaluación, aunque bloquea el efecto facilitador de ANG II. El propósito de los experimentos siguientes fue evaluar el efecto del antagonista de ANG II, SAR, sobre la MCS usando un entrenamiento fuerte.

Se condujeron tres experimentos, cada uno con dos pares de grupos CT-TR.

VEH-CT	vehículo-control
VEH-TR	vehículo-entrenado
SAR-CT	SAR 5pmol-control
SAR-TR	SAR 5pmol-entrenado

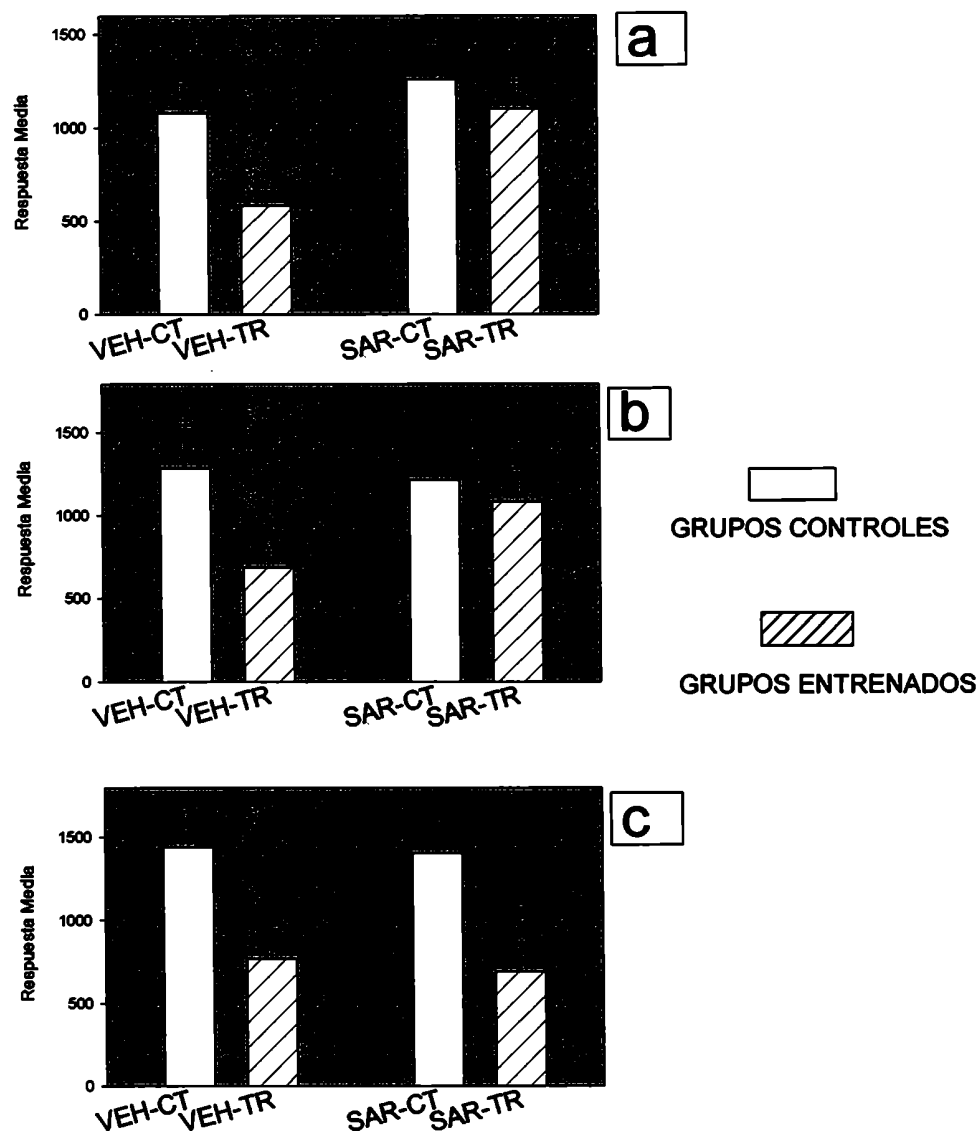
Las inyecciones se dieron inmediatamente antes de un protocolo de entrenamiento fuerte (15 ensayos separados por 171 sec.) (primer experimento,  $n=30$ ), o inmediatamente después del protocolo de entrenamiento fuerte de 30 ensayos separados por 81 seg., o una hora después del mismo (segundo y tercer experimento, respectivamente,  $n=32$ ). La razón para usar un entrenamiento más fuerte en los dos últimos experimentos está dada por el hecho que cuando los animales son inyectados después de entrenar, se suele producir un efecto amnésico de la misma inyección. Se ha demostrado que un entrenamiento de 30 ensayos con intervalo entre ensayos de 81 sec. induce una retención más fuerte que la producida por el entrenamiento de 15 ensayos y, además, la retención no es afectada por una inyección de post-entrenamiento (Pedreira, 1995).

Los resultados del bloque de 2 ensayos de evaluación correspondientes al primer experimento (inyección pre-entrenamiento) se visualizan en la Fig. 4.7a. Las comparaciones planeadas revelaron una diferencia significativa entre el par de grupos VEH, i.e. VEH-CT vs VEH-TR, [ $F(1,76) = 5.58$ ,  $p < 0.05$ ] (panel izquierdo), mientras que no se encontró ninguna diferencia significativa entre los grupos SAR i.e. SAR-CT vs SAR-TR (panel derecho). Se pone de evidencia así el efecto amnésico de SAR cuando se inyecta antes de un entrenamiento fuerte.

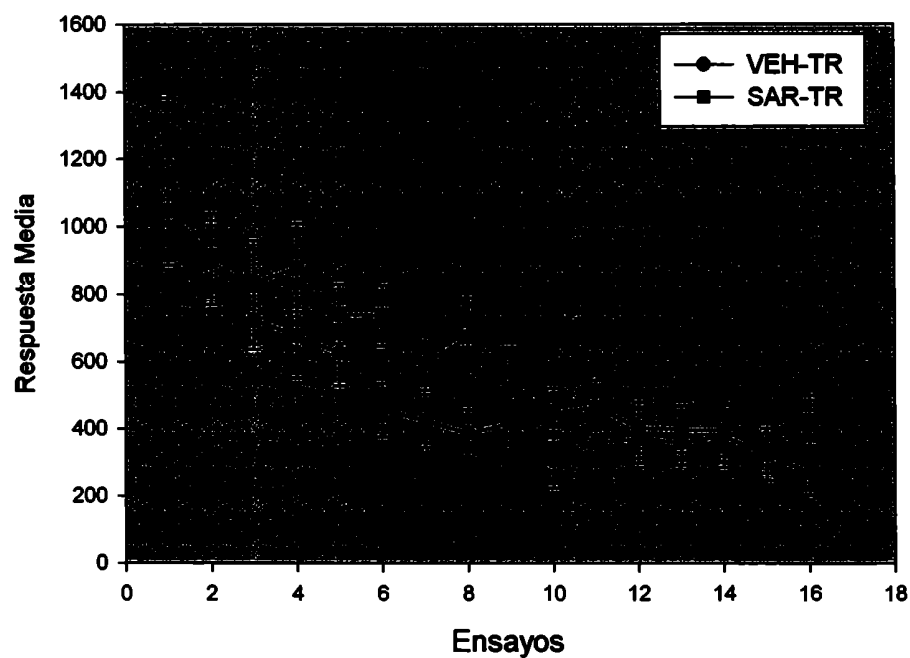
La Fig. 4.7b muestra los resultados correspondientes al segundo experimento (inyección inmediatamente luego del entrenamiento). Las comparaciones previstas revelaron una diferencia significativa entre grupos VEH (panel izquierdo) [ $F(1,124) = 6.53$ ,  $p < 0.05$ ], pero ninguna diferencia entre grupos SAR (panel derecho). Así pues, la memoria resultó también deteriorada cuando el SAR se inyectaba inmediatamente después del entrenamiento. Por el contrario, no se encontró efecto amnésico cuando SAR fue administrado una

hora después del entrenamiento (tercer experimento, Fig. 4.7c). Tanto los grupos VEH (panel izquierdo) como los grupos SAR (panel derecho) mostraron una diferencia significativa [ $F(1,124) = 7.27$   $p < 0.05$  y  $6.89$ ,  $p < 0.05$ ] respectivamente.

Es importante notar que la inyección de saralasina antes del entrenamiento (primer experimento) no mostró efecto sobre la habituación a corto término. Un ANOVA 2 x 15 indicó que no había efecto significativo del factor droga ni en la interacción droga-ensayo, pero sí un efecto significativo de ensayo [ $F(14,532) = 36,21$ ,  $p < 0.025$ ] (Fig. 4.8).



**FIGURA 4.7.-** Sesión de evaluación - Efecto del antagonista SAR, evaluado usando un protocolo de entrenamiento fuerte, sobre la MCS 24 horas luego de la sesión de entrenamiento. Sesión de evaluación de 2 ensayos. Animales inyectados con solución fisiológica de crustáceos (VEH) o con 5 pmol de SAR (SAR). Grupos controles (CT) y entrenados (TR). Inyecciones: **a)** pre-entrenamiento (sesión de entrenamiento: 15 ensayos, ITI 171 seg.), **b)** post-entrenamiento (sesión de entrenamiento: 30 ensayos, ITI 81 seg.), **c)** 1 h. luego del entrenamiento (sesión de entrenamiento: 30 ensayos, ITI 81 seg.). Ordenadas: media del valor de la respuesta de escape por grupo en el bloque de dos ensayos. Símbolos como Fig. 4.2



**FIGURA 4.8:** - Sesión de entrenamiento- Efecto de SAR, administrada inmediatamente antes de un protocolo de entrenamiento fuerte (15 ensayos separados por 171 seg.), sobre la respuesta durante la sesión de entrenamiento. Animales inyectados con solución fisiológica de crustáceos (VEH) y con 5 pmol de SAR (SAR). Datos de la sesión de evaluación corresponden a la Fig. 4.7a. Ordenadas: media del valor de la respuesta de escape por grupo en cada uno de los ensayos ( $n=30$ ). Símbolos como en Fig. 4.2.

#### 4.6 En busca de sub-tipo de receptor responsable del efecto facilitador de ANG II

Los resultados referentes a la acción de saralasina sobre la MCS en *Chasmagnathus* se han interpretado en el sentido que la acción de ANG II se ejercería a través de receptores específicos de ANG II.

Los experimentos siguientes fueron conducidos con el propósito de dilucidar si la acción de ANG II es mediada por subtipos de receptores tipo AT1 y AT2, similares a los de mamíferos, empleando antagonistas no peptídicos, específicos para el receptor del ANG II, losartan o DUP-753 (DUP, antagonista AT1), y PD-123177 (PD, antagonista AT2) (Timmermans, 1993) (ver Introducción, 1.9.4).

Con este objetivo, el siguiente experimento fue diseñado para establecer si los agonistas específicos para AT1 y AT2 podían bloquear el efecto facilitador de ANG II. Los cangrejos fueron sometidos a un protocolo de entrenamiento débil (10 ensayos) y después inyectados, formándose los siguientes grupos:

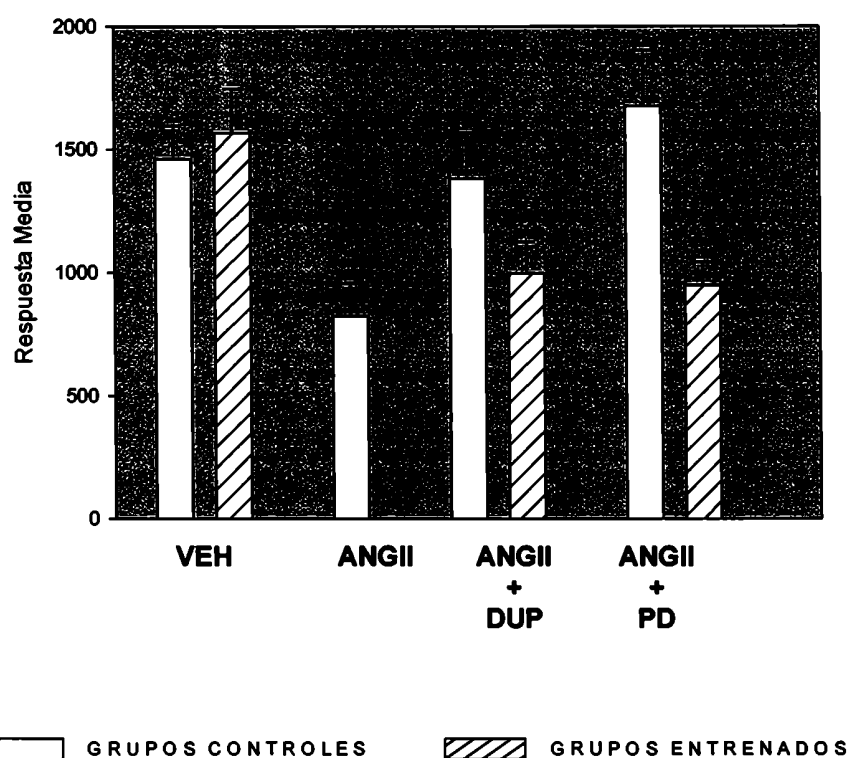
VEH-CT	vehículo-control
VEH-TR	vehículo-entrenado
ANGII-TR	ANG II 50pmol-entrenado
ANGII+DUP-CT	ANG II 50pmol+DUP 50pmol –control
ANGII+DUP-TR	ANG II 50pmol+DUP 50pmol –entrenado
ANGII+PD-CT	PD 50pmol+ANG II 50pmol-control
ANGII+PD-TR	PD 50pmol+ANG II 50pmol-entrenado

Para este experimento, y dada la gran cantidad de grupos a correr simultáneamente se optó por no utilizar el grupo ANGI-CT, considerando que en ningún experimento anterior de nuestro laboratorio se mostró efecto de este péptido sobre los controles.

Hubo 27 cangrejos por grupo excepto VEH-CT que incluyó 54 animales. Los resultados en la evaluación se muestran en la Fig. 4.9. Las comparaciones



planeadas entre cada grupo y VEH-CT revelaron una diferencia significativa para ANGII-TR [ $F(1,208)=8.4$ ,  $p < 0,01$ ], ANGII+DUP [ $F=4.4$ ,  $p < 0,05$ ] y ANGII+PD [ $F=5.4$ ,  $p < 0,05$ ] indicando así que ninguno de los dos antagonistas, DUP y PD, pudieron bloquear el efecto facilitador de ANG II. No se encontró diferencia significativa entre los grupos controles,



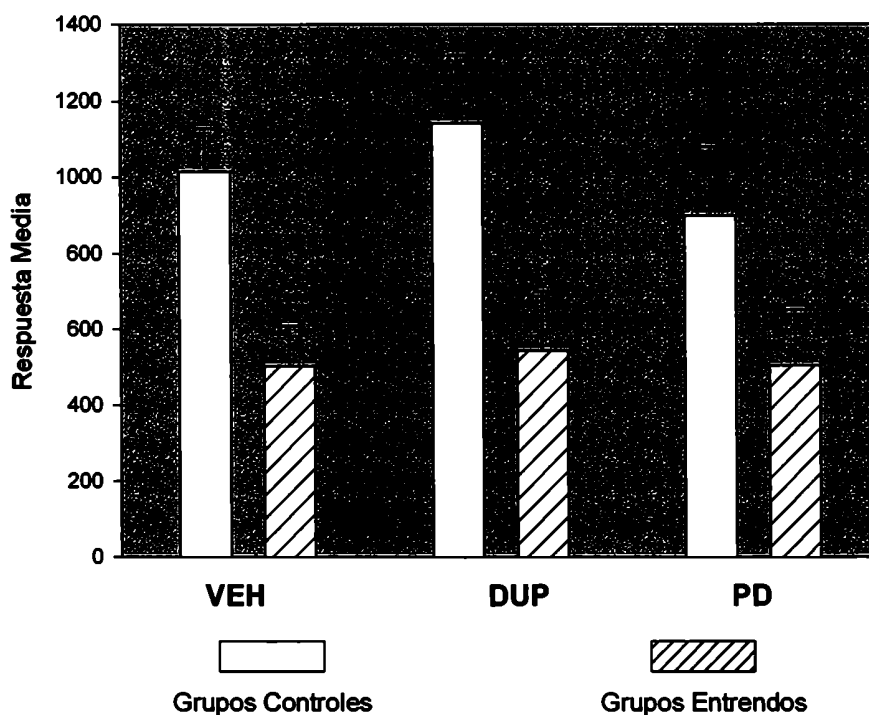
**FIGURA 4.9:** - Sesión de evaluación - Efecto de la co-inyección de ANG II con sus antagonistas DUP y PD, administrados inmediatamente después de un protocolo de entrenamiento débil (10 ensayos separados por 171 seg.), sobre la MCS evaluada 24 horas luego del entrenamiento. Sesión de evaluación de 2 ensayos. Animales inyectados con solución fisiológica de crustáceos (VEH), con 50 pmol de ANG II (ANGII), 50 pmol de ANG II más 50 pmol de DUP (ANGII+DUP) y con 50 pmol de ANGII más 50 pmol de PD (ANGII+PD). Grupos controles (CT) y entrenados (TR). Símbolos como Fig. 4.2

El siguiente experimento, tuvo como propósito evaluar si los antagonistas, DUP o PD, podían tener efectos amnésicos, inyectados inmediatamente antes de la sesión de entrenamiento. Es importante destacar

que estos antagonistas fueron diseñados con el fin de tener una prolongada vida media en el organismo, ya que éste es un requisito para un agente anti-hipertensivo de largo término (Timmermans, 1993). Tres grupos de cangrejos fueron entrenados con el protocolo fuerte de entrenamiento (15 ensayos separados por 171 seg.):

VEH-CT	vehículo-control
VEH-TR	vehículo-entrenado
DUP-CT	DUP 50pmol-control
DUP-TR	DUP 50pmol-entrenado
PD-CT	PD 50pmol-control
PD-TR	PD 50pmol-entrenado

Todos los grupos tenían 20 individuos excepto VEH-CT con 40. No se observó diferencia significativa entre los grupos durante la sesión entrenamiento (datos no presentados). Los resultados que corresponden a los 2 ensayos de evaluación se presentan en la Fig. 4.10. Las comparaciones planeadas descubrieron diferencia significativa para VEH-CT vs. VEH-TR [ $F(1,134)=8.1$ ;  $p < 0,01$ ] o DUP-TR [ $F=4.6$ ;  $p < 0.05$ ] o PD-TR [ $F=5.7$ ,  $p < 0,05$ ].



**FIGURA 4.10:** - Sesión de evaluación - Efecto de la inyección de los antagonistas de ANGII, DUP y PD, administrados antes de un protocolo de entrenamiento fuerte (15 ensayos separados por 171 seg.), sobre la MCS evaluada 24 horas luego del entrenamiento. Sesión de evaluación de 2 ensayos. Animales inyectados con solución fisiológica de crustáceos (VEH), con 50 pmol de DUP (DUP) y con 50 pmol de PD (PD). Grupos controles (CT) y entrenados (TR). Barras blancas: grupos CT, barras rayadas, grupos TR. Símbolos como Fig. 4.2

Estos resultados nos conducen a concluir que ANG II induce un mejoramiento de la Memoria Contexto Señal (MCS) a través de un subtipo de receptor que sería, en principio, diferente de AT1 o de AT2 de mamíferos, ya que antagonistas específicos no son capaces de revertir los efectos facilitadores de ANG II. Estos experimentos fueron replicados obteniéndose los mismos resultados, aún cuando se usaron dosis tan altas como 500 nmol/animal. Dado que el antagonista DUP aparece a veces en la literatura teniendo un efecto mejorador sobre la memoria (Introducción, 1.9.8), se diseñaron experimentos en los que se administra DUP a *Chasmagnathus* una

hora antes o inmediatamente después de un entrenamiento débil. No se detectaron efectos estadísticamente relevantes.

#### 4.7 ANG IV, un fragmento activo de la ANG II es suficiente para mostrar el efecto facilitador.

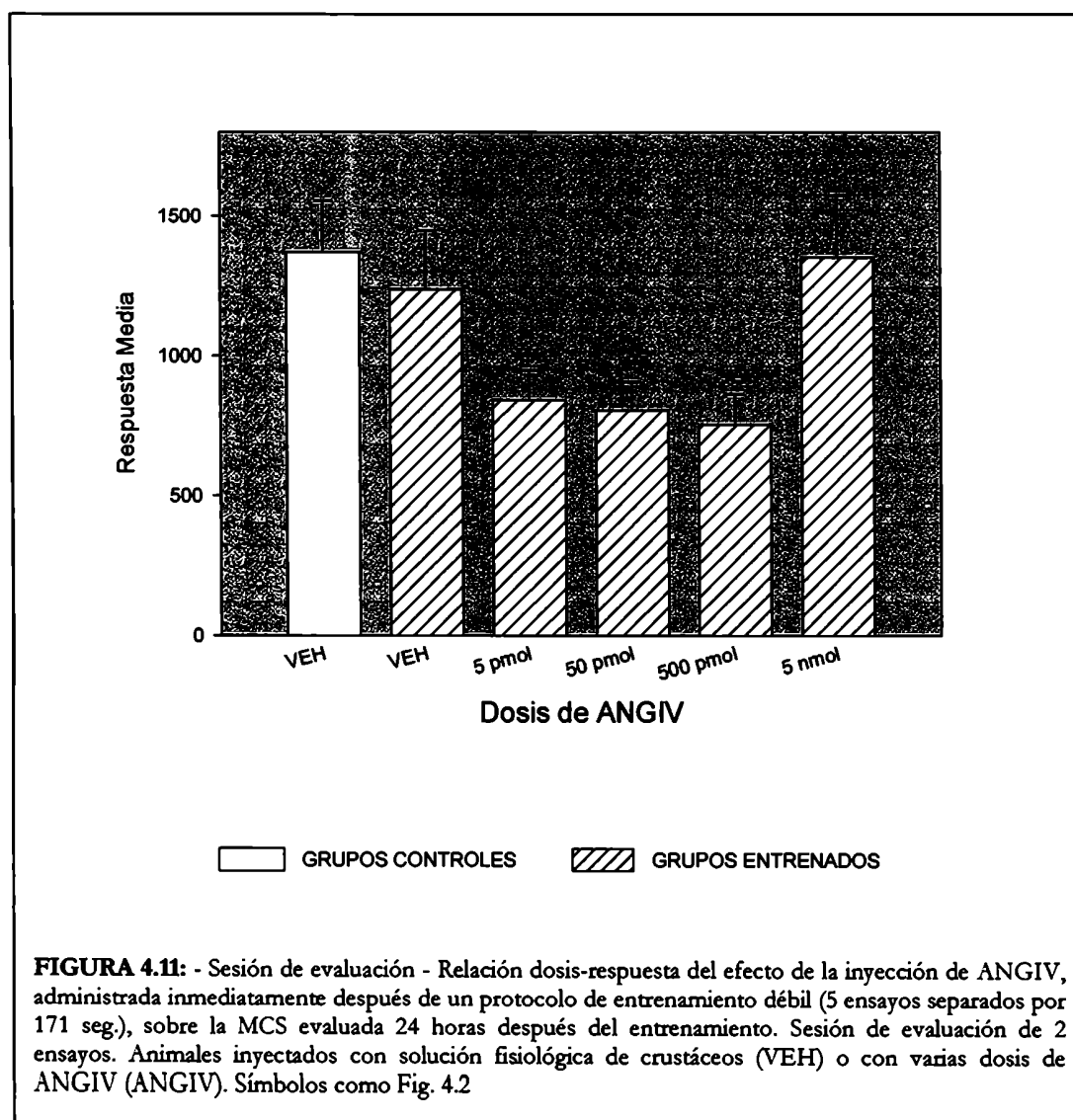
Hasta este momento no se ha considerado la posibilidad que fragmentos más cortos y metabólicamente activos de ANG II, en vez del octapéptido entero, fueran los compuestos que induzcan la facilitación de la memoria durante la consolidación. Como se mencionó en la Introducción (Introducción, 1.9.8), se ha informado en vertebrados la presencia del fragmento activo de ANG II, ANG II(3-8), llamada angiotensina IV (ANG IV) y se han identificado receptores específicos (AT<sub>4</sub>) en cerebro y tejidos finos periféricos. El papel de ANG IV, con respecto a funciones tradicionales del RAS, es bastante desconocido, aunque se ha señalado recientemente que este fragmento mediaría, de una manera similar a la acción de ANG II, el estímulo de la síntesis celular de DNA y RNA y la regulación del flujo sanguíneo en cerebro y riñón (revisado en Wright, 1997). Además, hay resultados indicativos que la administración i.c.v. de ANG IV es eficaz en mejorar tanto la evocación como la retención de una respuesta condicionada de evitación pasiva en roedores (Introducción, 1.9.8).

Con el objetivo de probar si ANG IV tiene un efecto que facilita la MCS, se realizó un experimento con diversas dosis de ANG IV. Cinco grupos de 20 cangrejos cada uno, fueron sometidos a un protocolo de entrenamiento débil (5 ensayos, IEE 171 seg.) e inyectados con diversas dosis de ANG IV inmediatamente después del entrenamiento. Un sexto grupo fue el VEH-CT con 40 animales.

VEH-CT	Vehículo-control
VEH-TR	Vehículo-entrenado
ANGIV-TR 0.005	ANGIV 5 pmol-entrenado
ANGIV-TR 0.05	ANGIV 50 pmol-entrenado
ANGIV-TR 0.5	ANGIV 500 pmol-entrenado

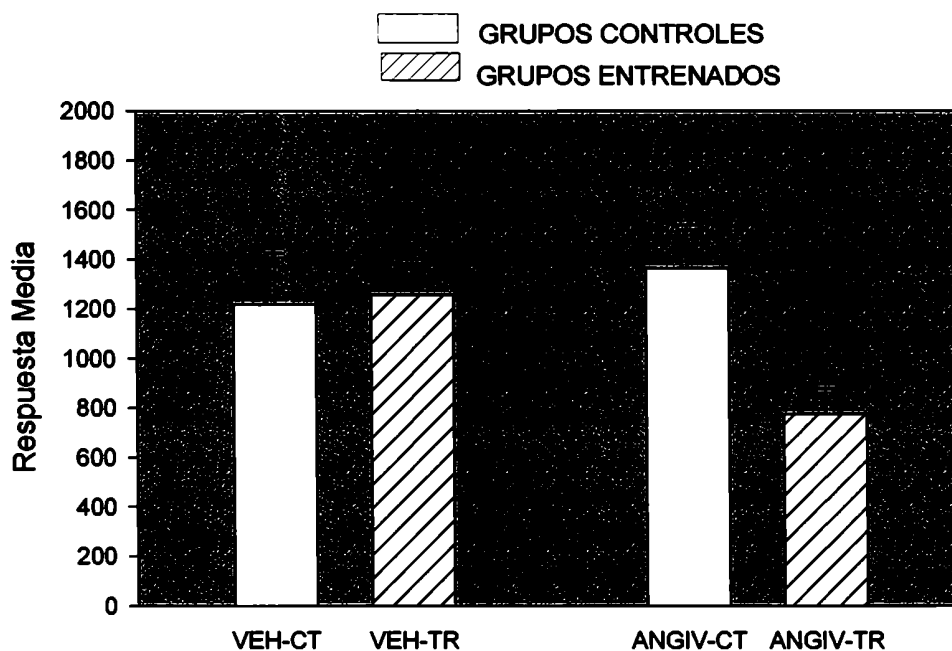
ANGIV-TR 5	ANGIV 5 nmol-entrenado
------------	------------------------

Los efectos de las dosis de ANG IV durante la evaluación se presentan en la Fig. 4.11. La relación dosis-respuesta aparece como una función en U, similar a la de ANG II, i.e. una forma de curva habitual en estudios referentes al efecto de neuropéptidos en procesos de la memoria (De Wied, 1997). Las comparaciones planeadas entre cada grupo y VEH-CT revelaron una diferencia significativa para las dosis de ANG IV de 0.005, 0.05 y 0.5 nmol [ $F(1,133)=7.3$ ;  $F = 6,9$  y  $F = 7,9$ , respectivamente;  $p < 0,01$ ]. Réplicas de este experimento confirmaron estos resultados, demostrando además, que cantidades tan pequeñas como 0,5 pmol por animal, podían tener, a veces, efecto facilitador (datos no presentados).



El siguiente experimento fue realizado con el propósito de considerar la posibilidad que los resultados, mostrando a ANG IV como agente facilitador, se deban a un efecto inespecífico de la droga. Se formaron cuatro grupos de 20 cangrejos cada uno.

VEH-CT	vehículo-control
VEH-TR	vehículo-entrenado
ANGIV-CT	ANGII 5pmol-control
ANGIV-TR	ANGII 5pmol-entrenado



**FIGURA 4.12:-** Sesión de evaluación - Efecto de la inyección de ANG IV, administrada inmediatamente después de un protocolo de entrenamiento débil (5 ensayos separados por 171 seg.), sobre la MCS evaluada 24 horas. Sesión de evaluación de 2 ensayos. Animales inyectados con solución fisiológica de crustáceos (VEH), con 5 pmol de ANGIV (ANGIV). Grupos controles (CT) y entrenados (TR). Símbolos como Fig. 4.2

Los grupos ANGIOV-CT y ANGIOV-TR se inyectaron con 5 pmol de ANGIOV IV inmediatamente luego del entrenamiento. Los grupos entrenados recibieron un protocolo de entrenamiento débil de 5 ensayos.

Los resultados, que corresponden a los bloques de evaluación de 2 ensayos, se ilustran en la Fig. 4.12. Las comparaciones previstas mostraron una diferencia significativa para ANGIOV-CT contra ANGIOV-TR [ $F(1, 76) = 6.3$ ;  $p < 0,01$ ] pero no para VEH-CT contra VEH-TR ni entre los controles. Se confirma así el efecto facilitador de ANGIOV IV, descartándose una explicación basada en un efecto inespecífico sobre la respuesta.

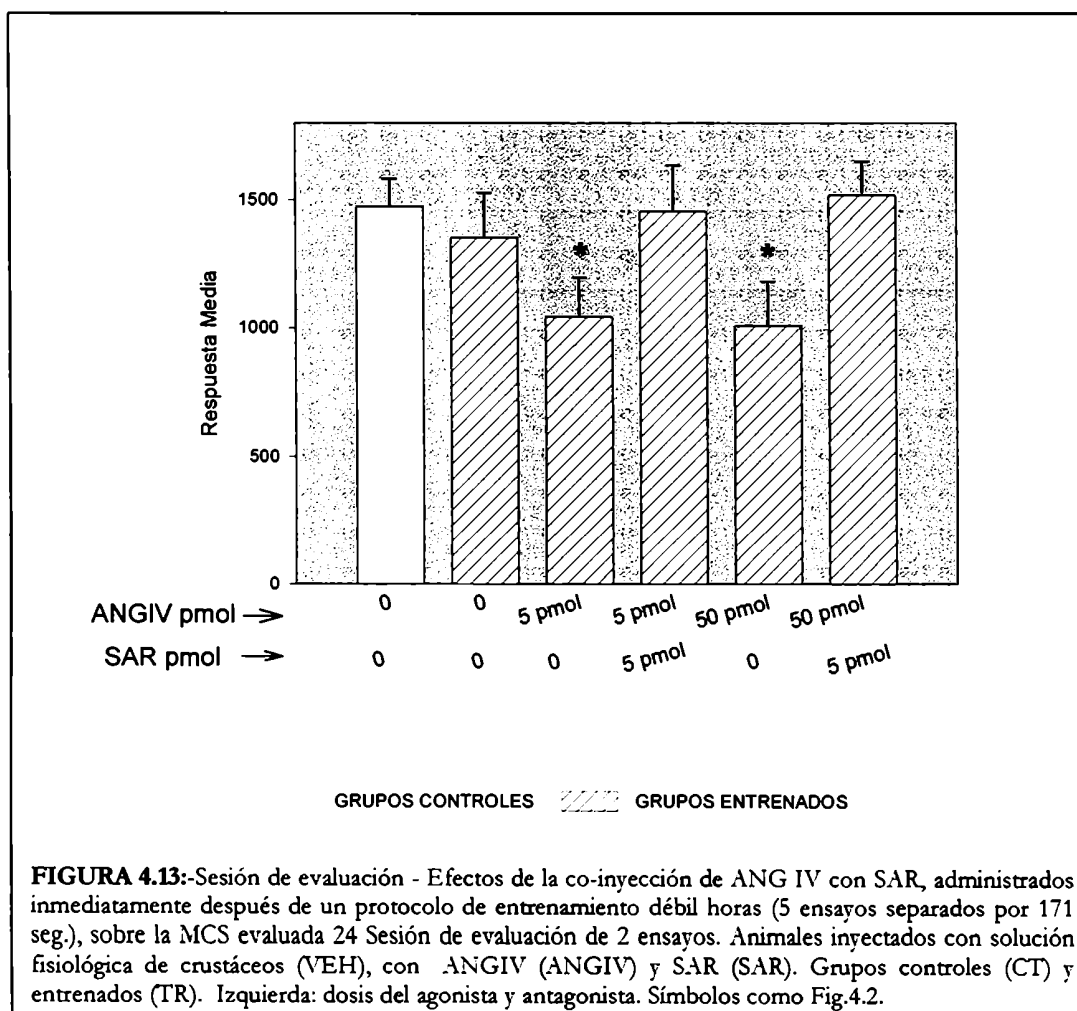
Por lo tanto, la administración sistémica de ANGIOV IV permite, aún con una cantidad insuficiente de entrenamiento, inducir MCS. Tal efecto parecería ser más fuerte que el obtenido en los experimentos previos con ANGIOV II, puesto que para inducir una facilitación de la MCS con el octapéptido entero se requiere un entrenamiento más largo (10 en vez de 5 ensayos).

Los resultados precedentes parecen sugerir que el efecto de ANGIOV II en MCS no es debido a su propia acción sino al fragmento ANGIOV IV. De esta manera, ANGIOV IV, y no ANGIOV II, sería la angiotensina que desempeña un papel significativo dentro de la cascada de eventos relacionados con la consolidación de la MCS. Sin embargo, SAR fue capaz de bloquear la facilitación de la memoria cuando se inyectaba con ANGIOV II después de un entrenamiento débil (fig. 4.6) y, además, tenía un efecto amnésico cuando era dada después de un entrenamiento fuerte (Fig. 4.7). Esto último parece estar en desacuerdo con la posibilidad de un papel exclusivo de ANGIOV IV en la consolidación de la memoria, puesto que SAR tiene efectos bien conocidos en la familia de receptores de ANGIOV II pero no es capaz de antagonizar a ANGIOV IV (Timmermans, 1993).

No obstante estos resultados, pareció pertinente explorar la acción de SAR con relación al efecto facilitador de ANGIOV IV sobre la MCS. Con ese propósito se condujo el siguiente experimento, que incluyó grupos de animales entrenados ( $n=32$ ) con un protocolo de entrenamiento débil de 5 ensayos e inyección post-entrenamiento de vehículo, ANGIOV IV, SAR o ambas drogas a la vez y un grupo VEH-CT que consistió de 64 animales:

VEH-CT	Vehículo-control
VEH-TR	Vehículo-entrenado
ANGIV-TR 0.5	ANGIV 0.5pmol-entrenado
ANGIV 0.5+SAR 5-TR	ANGIV 0.5nmol+ SAR 5 pmol-entrenado
ANGIV-TR 50	ANGIV 50nmol-entrenado
ANGIV-TR 50+SDAR 5-TR	ANGIV 50nmol+ SAR 5 pmol-entrenado

Los resultados correspondientes a los bloques de evaluación de dos ensayos se visualizan en la Fig. 4.13. Las comparaciones entre VEH-CT vs. 0,5 o 50 de pmol de ANGIV-TR muestran diferencias significativas [ $F(1,186)=5.9$   $p<0.05$  y  $F=4.9$ ,  $p<0.05$ , respectivamente]. Estas diferencias se suprimieron cuando el péptido se coinyectó con SAR, indicando así que el efecto facilitador de ANG IV se revierte por un antagonista para ANG II, resultado que está en conflicto con el hecho que SAR no afecta, al menos en vertebrados, la unión al receptor de ANG IV (Wright, 1995).





A esta altura, presentamos dos hipótesis para explicar los resultados precedentes con relación a la acción de ANG II y ANG IV sobre la MCS de *Chasmagnathus*. Ambas hipótesis suponen que cada péptido actúa en subtipos de receptores diferentes.

Según una primera visión, ANG II y ANG IV inducirían la facilitación de la memoria en este cangrejo a través de diversos subtipos específicos de receptor. La acción de ANG II sería mediada por un receptor distinto a los descritos para mamíferos, puesto que ni DUP o PD mostraron efectos amnésicos después de un protocolo de entrenamiento fuerte, o fueron capaces de bloquear el efecto facilitador de ANG II después de un protocolo de entrenamiento débil. Debe observarse que no hay hasta el momento receptores de angiotensina descritos en invertebrados. Desde el punto de vista de esta hipótesis, SAR se une a un subtipo de receptor para ANG II, insensible a DUP o PD, produciendo así un efecto amnésico que, a la vez, enmascararía el efecto facilitador de ANG IV cuando ambos compuestos son coinyectados.

La segunda hipótesis propone que los efectos obtenidos con ANG II son una consecuencia del metabolito activo ANG IV, es decir, que ANG IV es el agente responsable del efecto facilitador de la angiotensina sobre la MCS. Una suposición básica de esta propuesta es que la formación de ANG IV de este cangrejo implica, como en mamíferos, clivajes sucesivos del N-terminal de ANG II a ANG IV (Wright, 1994). Por consiguiente, la molécula de SAR también se clivaría a un fragmento que sería capaz de antagonizar a ANG IV en su receptor putativo de cangrejo. De ahí entonces, que SAR tenga un efecto amnésico después de un entrenamiento fuerte o es capaz de bloquear el efecto facilitador de ANG IV cuando con ambos compuestos se coinyectaban después de un entrenamiento débil.

#### 4.8 La facilitación de la Memoria Contexto Señal por el sistema angiotensinérgico en *Chasmagnathus* está mediada por ANG II endógena.

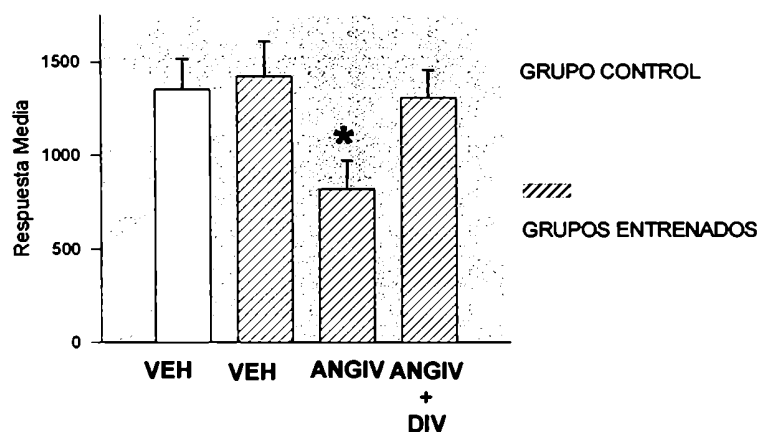
La siguiente serie de experimentos fue diseñada con el propósito de poner a prueba las hipótesis planteadas. Para tal fin, se utilizó un antagonista

recientemente desarrollado (Dival), que es capaz de bloquear en roedores todos los efectos conocidos de ANG IV, y que funciona como agente amnésico cuando se inyecta i.c.v. en ratas (Wright, 1995).

En un primer experimento, tres grupos de cangrejos recibieron entrenamiento débil (7 ensayos), para ser luego inyectados con el vehículo, ANG IV o ANG IV más Dival. Además, se agregó un grupo control (VEH-CT) inyectado con el vehículo. Todos los grupos tenían 35 cangrejos.

VEH-CT	vehículo-control
VEH-TR	vehículo-entrenado
ANGIV-TR	ANG IV 5pmol-control
ANGIV+DIV-TR	ANG IV 5pmol+ DIV 5pmol-entrenado

Los resultados en la sesión de evaluación se muestran en el Fig. 4.14. Las comparaciones previstas entre cada grupo entrenado y VEH-CT revelaron una diferencia significativa solamente para ANGIV-TR contra VEH-CT [ $F(1, 132)=5.44$ ;  $p < 0,05$ ]. Así, el efecto facilitador de ANG IV resultó bloqueado cuando se la coinyectaba con el antagonista específico Dival.

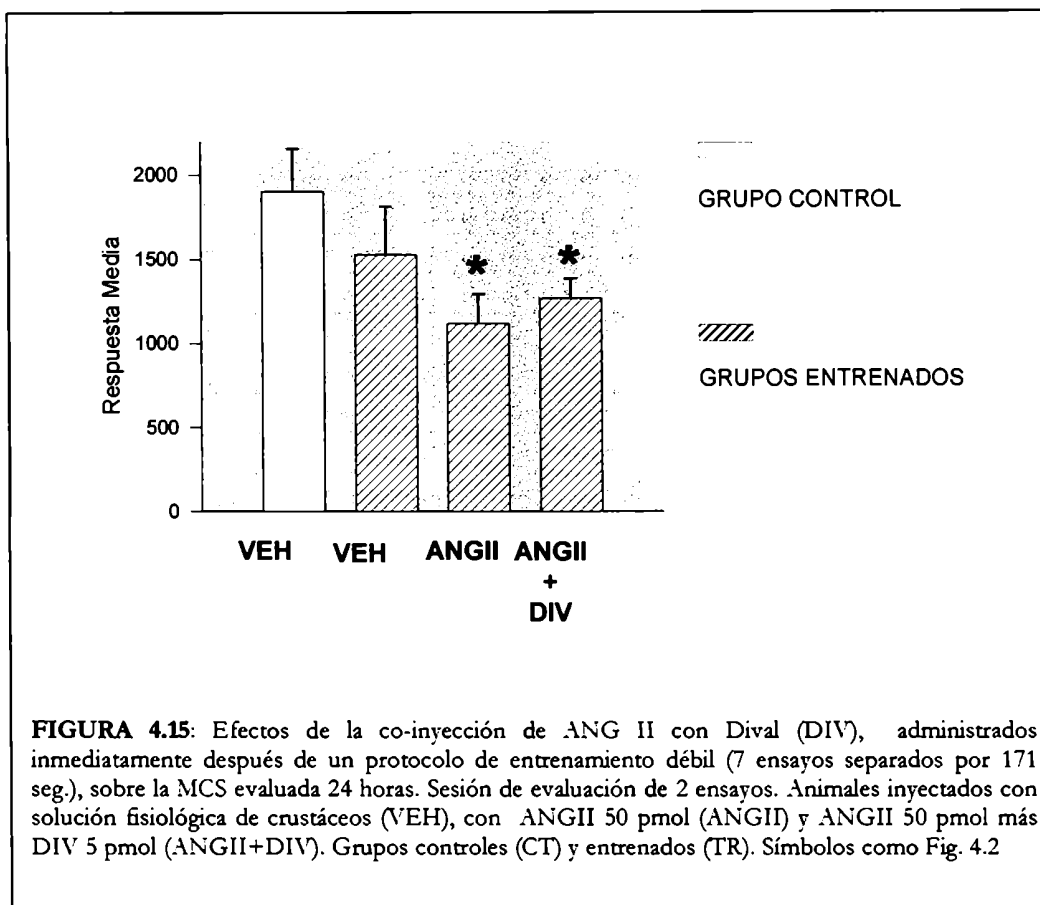


**FIGURA 4.14:** - Sesión de evaluación - Efectos de la co-inyección de ANG IV con su antagonista DIV, administrados inmediatamente después de un protocolo de entrenamiento débil (7 ensayos separados por 171 seg.), sobre la MCS evaluada 24 horas. Sesión de evaluación de 2 ensayos. Animales inyectados con solución fisiológica de crustáceos (VEH), con ANG IV 5 pmol (ANGIV) y ANG IV, 5pmol más DIV 5 pmol (ANGIV+DIV). Grupos controles (CT) y entrenados (TR). Símbolos como Fig. 4.2

Un segundo experimento exploró el efecto de Dival con relación a ANG II. Si la hipótesis según la cual la facilitación de la memoria por ANG II es debida a su metabolito activo ANG IV fuese cierta, debería esperarse que una inyección de Dival sería capaz de bloquear tal facilitación. Tres grupos de cangrejos fueron entrenados con protocolo de entrenamiento débil (7 ensayos) e inmediatamente después inyectados con el vehículo, ANG II, o ANG II más Dival. Además, un grupo de control (VEH-CT) fue inyectado con el vehículo, Todos los grupos tenían 36 cangrejos.

VEH-CT	vehículo-control
VEH-TR	vehículo-entrenado
ANGII-TR	ANGII 50pmol-control
ANGII+Dival-TR	ANGII 50 pmol+ Dival 5 pmol-entrenado

Los resultados en la sesión de evaluación se muestran en la Fig. 4.15. Las comparaciones planeadas entre cada grupo entrenado y VEH-CT revelaron una diferencia significativa para ANG II [ $F(1, 136) = 7.76, p < 0.05$ ] así como para ANGII+DIV-TR [ $F(1, 136) = 5.67, p < 0.05$ ], indicando que Dival no es capaz de revertir el efecto facilitador de ANG II, es decir, que ANG II induce la facilitación de la memoria independientemente de ANG IV.



Este último resultado está en desacuerdo con la hipótesis que ANG IV es el *único* agente angiotensinérgico con efecto facilitador sobre el MCS de *Chasmagnathus*. Sin embargo, para concluir que la hipótesis alternativa es correcta, es decir, que *ambas* angiotensinas están modulando la MCS, se requeriría demostrar el papel endógeno tanto de ANG II como de ANG IV. Una aproximación experimental habitualmente usada para aceptar el papel endógeno de un neuropéptido facilitador en un proceso de memoria es demostrar efectos amnésicos de su antagonista (De Wied 1997). En nuestro caso, antagonistas de ANG II y de ANG IV, deberían exhibir efecto amnésico después de un entrenamiento fuerte.

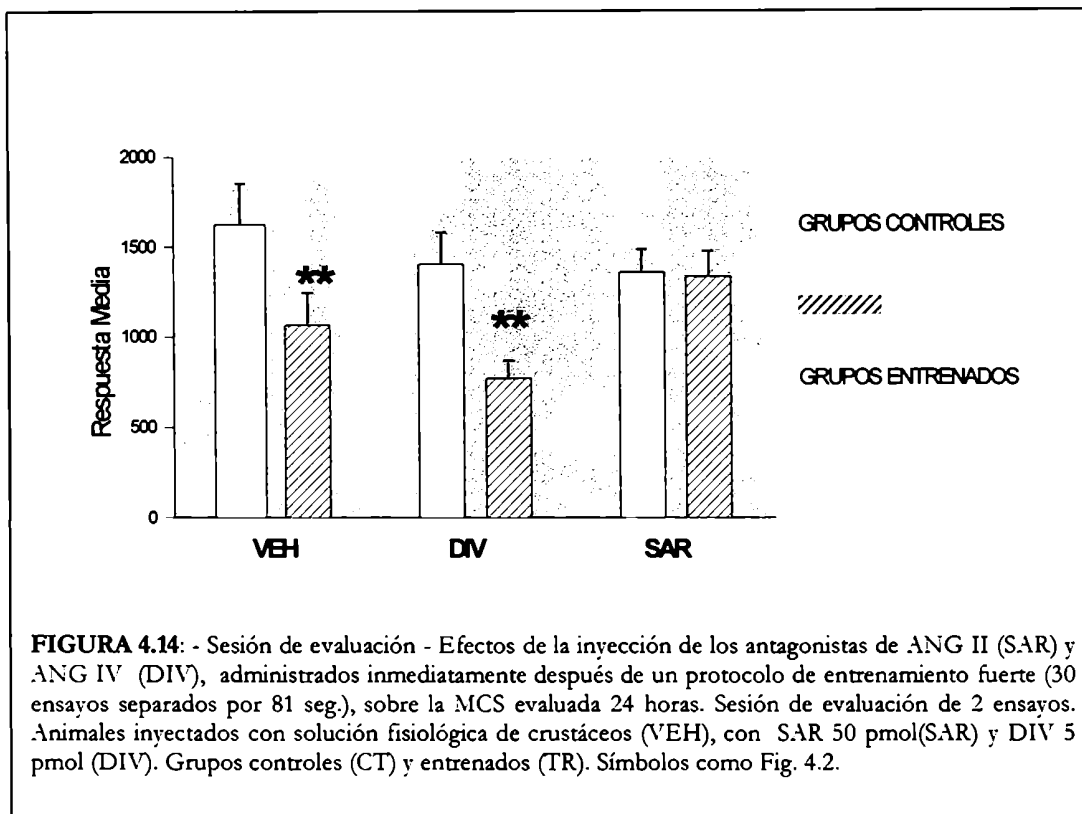
Se formaron tres pares de grupos de cangrejos (CT-TR). Un par fue inyectado con vehículo (VEH), un segundo par con antagonista para ANG IV, Dival y, un tercer par con el antagonista para ANG II, SAR. Los grupos TR recibieron un entrenamiento fuerte de 30 ensayos y las inyecciones se

administraron inmediatamente después de la sesión de entrenamiento. Cada grupo tenía 34 individuos.

VEH-CT	vehículo-control
VEH-TR	vehículo-entrenado
DIV-CT	Dival 5pmol-control
DIV-TR	Dival 5pmol-entrenado
SAR-CT	Saralasina 50 pmol-control
SAR-TR	Saralasina 50 pmol-entrenado

Los resultados que corresponden al bloque de dos ensayos de la sesión de evaluación, se ven en la Fig. 4.16. Las comparaciones planeadas demostraron una diferencia significativa para VEH-CT contra VEH-TR [ $F(1, 128)=11.26$ ,  $p<0.01$ ] y entre DIV-CT contra DIV-TR [ $F(1, 128)=9.44$ ,  $p<0.01$ ], pero no para el par SAR-CT SAR-TR ni para los controles. Tampoco se obtuvo ningún efecto amnésico de Dival con dosis de 50pmol o 5 nmol/animal, ni con inyecciones dadas pre-entrenamiento (datos no mostrados).

De esta manera, mientras que SAR mostró un evidente efecto amnésico sobre la MCS, confirmando una vez más resultados anteriores, no se produjo efecto amnésico debido por la inyección del antagonista de ANG IV, Dival.



#### 4.9 El antagonista de ANG II, SAR, revela un efecto amnésico en un protocolo de entrenamiento masivo

Como se explicó en la Introducción (Introducción, 1.4.5), la MCS se adquiere siempre que se da un **entrenamiento espaciado** de 15 o más ensayos con un intervalo mayor a 27 segundos. Si el intervalo es igual o menor a 9 segundos, sólo se puede demostrar retención de la memoria en una sesión de evaluación a 24 horas, si se da un entrenamiento con más de 100 ensayos, o sea un **entrenamiento masivo** (EM). Asimismo, esta retención se expresa sólo en la fase de re-entrenamiento de una sesión de evaluación de seis ensayos. A este último tipo de memoria basada en un EM se la denominó Memoria Señal (MS). Se ha podido identificar una serie de diferencias comportamentales y fisiológicas entre MCS y MS (Introducción, 1.4.5).

El protocolo experimental usado a lo largo de esta Tesis está basado en el entrenamiento espaciado, es decir, se trata de un estudio centrado en la MCS. Sin embargo, en el siguiente experimento se va a recurrir a un protocolo

de entrenamiento masivo y el proceso mnésico a considerar será aquel de la MS. Nos proponemos explorar si el antagonista de ANG II, SAR, tiene también efecto amnésico sobre la MS. La posibilidad de que el sistema angiotensinérgico esté involucrado en dos mecanismos mnésicos diversos, tiene interés en al menos dos aspectos. Primero, estaría de acuerdo con lo que se ha señalado como una característica de los sistemas moduladores del almacenamiento de la memoria, es decir, la posibilidad de influenciar formas diferentes de memoria (Cahill, 1996). Segundo, plantearía como tema a investigar en *Chasmagnathus*, la relación entre la acción moduladora de las angiotensinas y diversos sistemas de neurotransmisión y vías de transducción de señales que se viene describiendo separadamente para la MCS y la MS (Introducción, 1.4.5). Se formaron los siguientes grupos:

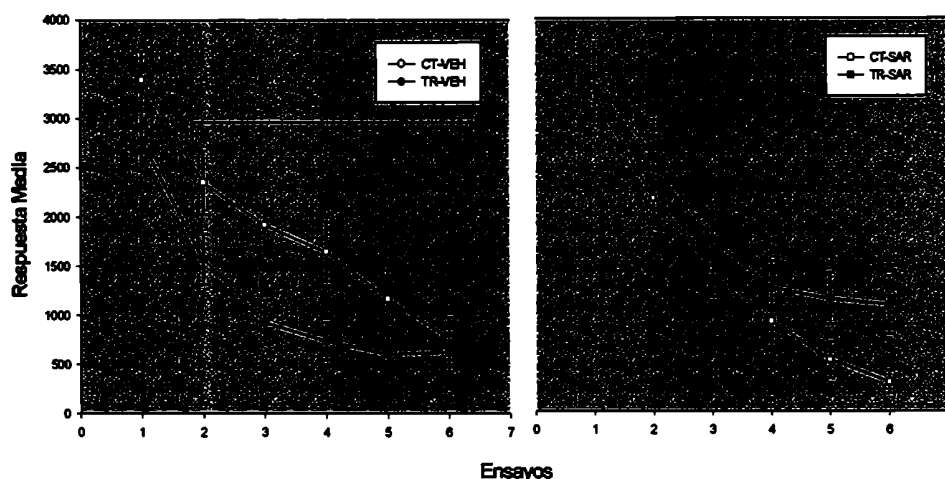
Grupo	Inyección pre-entrenamiento	Entrenamiento	Evaluación
VEH-CT	Vehículo	-	6 ensayos, EM
VEH-TR	Vehículo	300 ensayos, EM	6 ensayos, EM
SAR-CT	SAR 50 pmol	-	6 ensayos, EM
SAR-TR	SAR 50 pmol	300 ensayos, EM	6 ensayos, EM

Los resultados de la sesión de evaluación (Fig. 4.17) se resumen en tres puntos.

a) No se presentan diferencias significativas entre controles VEH-CT y SAR-CT tanto en el primer ensayo como en la fase de re-entrenamiento.

b) No hubo diferencia entre VEH-CT y VEH-TR respecto al primer ensayo, pero sí en la fase de re-entrenamiento [ $F(1, 153) = 5.16$ ,  $p < 0.05$ ] (Fig., 4.17), un resultado esperado ya que la MS sólo se expresa en la fase de re-entrenamiento de la evaluación (Introducción, 1.4.5).

c) Cuando se compararon los grupos SAR-CT vs SAR-TR, no se pudieron encontrar diferencias tanto en el primer ensayo como en la fase de re-entrenamiento, revelando así el efecto amnésico del agonista también en este tipo de memoria. Tampoco se pudieron detectar diferencia en los grupos VEH-TR y SAR-TR durante el entrenamiento (datos no presentados)



**Fig. 4.17:** Sesión de evaluación de 6 ensayos 24 h después de un protocolo de entrenamiento masivo (300 E, intervalo entre ensayos de 4 seg.). Inyección pre-entrenamiento de VEH: grupos vehículo, SAR: inyectados con 50 pmol del antagonista de ANGII, saralasina. Símbolos como Fig. 6.2.

#### 4.10 Conclusiones del Capítulo 4

ANG II, pero no ANG IV, sería la angiotensina endógena que desempeña un papel significativo dentro de la cascada de los acontecimientos relacionados con la adquisición y/o la consolidación de la MCS en *Chasmagnathus*. Tal conclusión es sostenida por tres líneas de evidencia basadas en los experimentos de este capítulo.

Primero, ANG II tiene un efecto facilitador de la memoria puesto que mejora la retención de la MCS cuando es inyectada después de un protocolo de entrenamiento débil. La posibilidad de algún efecto amnésico está descartada, pues la MCS no es afectada aún después de administrar grandes dosis de ANG II antes o después de un protocolo de entrenamiento fuerte.



Segundo, la saralasina, antagonista de ANG II, suprime la facilitación de la memoria cuando se coinyecta con ANG II después de un entrenamiento débil y, además, exhibe un efecto amnésico notable cuando es dada después o antes de un entrenamiento fuerte.

Tercero, ANG IV demuestra un efecto facilitador que es bloqueado por Dival, antagonista de ANG IV [un resultado sobre la memoria similar al obtenido en mamíferos (Wright, 1995)], pero no produce efecto amnésico

En resumen, ANG II actuaría como reforzador o facilitador de la MCS. El receptor de ANG IV no parece estar involucrado en la cascada de eventos relacionados con la MCS.

El hecho que este neuropéptido intervenga en los dos procesos mnésicos anteriormente mencionados, MCS y MS, es coherente con la idea de que la ANG II estaría actuando como parte de un sistema extrínseco de memoria (Kovaks, 1994), es decir, no sería un componente del proceso mnésico en sí mismo. La acción facilitadora de ANG II parecería entonces mnésica inespecífica, ya que MCS y MS son dos tipos diferentes de memoria que, a pesar de originarse en la presentación reiterada de un mismo estímulo de peligro, difieren en la duración del intervalo entre ensayos y presentan características muy distintas (Introducción, 1.4.5). Es importante notar aquí que nuestros resultados indican que los antagonistas específicos para AT1 y AT2 (DUP y PD respectivamente) (Capítulo 4, 4.4 y 4.8), no parecen tener efecto sobre los receptores de *Chasmagnathus*, pero sí los antagonistas de origen peptídico usados (SAR y DIV) (Capítulo 4, 4.5 y 4.8). Tampoco hemos podido revelar efecto facilitador de los antagonistas, DUP y PD.

Resulta llamativo que esta acción amnésica de SAR se dé sobre la MCS, ya que esta memoria, a diferencia de la MCS, parece ser insensible a los inhibidores de la síntesis proteica (Hermitte, 1999). En otras palabras, resulta llamativo que la MS de duración intermedia (menos de 3 días) no sea afectada por una parálisis de la síntesis de proteínas cercana al 90% y de dos horas de duración, pero sí por una interferencia en el sistema de las angiotensinas

provocada por un antagonista de vida media corta. Este contraste, además de reinstalar la discusión acerca de la posibilidad de una memoria de duración intermedia independiente de la síntesis de proteínas, plantea un tema central de próximas investigaciones, a saber, la relación del sistema de las angiotensinas con dos mecanismos mnésicos diferentes, el de la MS y el de la MCS. Cabe advertir que existen dos modelos de invertebrados donde esta situación parece repetirse. Un modelo es el de *Drosophila*, que sería capaz de formar un tipo de memoria insensible a anestesia y a inhibidores de síntesis proteica (Tully, 1994). Un segundo modelo, muy bien estudiado, es el aprendizaje apetitivo a un estímulo olfativo en abejas (Meller, 1996; Menzel, 1996). Esta memoria no es afectada por inhibidores de síntesis proteica cuando se evalúa hasta tres días luego del entrenamiento (Menzel, 1996), pero sí al cuarto día (Wustenberg, 1998). Se distingue así en la abeja, dos formas de memoria, una independiente de síntesis proteica, o memoria intermedia (3 días), y otra de largo plazo, cuatro días o más. Sin embargo, diversos neurotransmisores (e.g. acetilcolina, octopamina) están involucrado en la adquisición, consolidación y recuperación de ambas formas de memoria (Menzel, 1996).

## Capítulo 5

**Resultados: *Papel funcional del efecto de las angiotensinas sobre la memoria en Chasmagnathus. En busca de un disparador endógeno del efecto mnésico de las angiotensinas***

### 5.1 Hipótesis

Si se consideran los resultados de las sesiones anteriores claramente indicativos que las angiotensinas potencian la memoria a largo plazo en este cangrejo, cabría preguntarse ¿cuál puede ser el papel funcional de esta modulación de la memoria en *Chasmagnathus*?

Como se mencionó en la Introducción (Introducción, 1.4.3), se ha dado una respuesta algo genérica a este tipo de pregunta en trabajos de mamíferos; se ha dicho “sería ventajoso, tanto como económico, poder regular el almacenaje de la memoria de manera tal que la fuerza con que una memoria se consolida esté relacionada con la importancia que tiene la experiencia para el animal” (Cahill, 1996). Sin embargo, para obtener una respuesta más concreta, sería necesario, antes que nada, investigar cuál es el acontecimiento que activa este mecanismo modulador. La pregunta inicial se convierte así en la siguiente: ¿qué cambio en el medioambiente induce esta facilitación de la memoria en *Chasmagnathus*?

Nuestra hipótesis es que un mismo estímulo externo dispararía acciones coordinadas de las angiotensinas, de tal manera que éstas sean responsables, al menos en parte, de una rutina comportamental coherente del animal que incluya, entre otros cambios, alteraciones en la capacidad de almacenar la memoria. Esta idea coincide en lo fundamental, con el esquema teórico propuesto por Wright (Wright, 1994), según el cual una alteración ambiental, como la escasez de agua, activa en mamíferos una serie de acontecimientos fisiológicos y comportamentales. Los cambios fisiológicos llevan al animal a preservar la mayor cantidad de agua posible, mientras que los segundos llevan a aumentar los niveles de exploración del terreno, así como cambios en capacidades mnésicas, lo que en su conjunto tiende a elevar la posibilidad que el animal encuentre una fuente de agua.

Por lo tanto, en el centro de nuestra hipótesis esta la suposición **que un cambio externo produce un aumento en el nivel de angiotensinas y, al mismo tiempo, una mejora de la MCS junto a modificaciones adicionales en otras variables.**

Pero, ¿qué cambio externo? Dos hechos básicos han venido a sugerirnos que un cambio en la salinidad medioambiental sería el estímulo

disparador de mecanismos mediados por péptidos similares a angiotensinas. Primero, *Chasmagnathus* es un animal eurihalino [habita generalmente en agua salobre (10,0 a 14,0‰)], pero capaz de vivir en agua de muy diversas salinidades (D'Incao, 1992). Segundo, estudios anteriores en diversas especies de peces eurihalinos mostraron correlatos positivos entre concentración en el cerebro de ANGII y salinidad ambiental (Galli, 1996).

## **5.2 Exposición a distintas salinidades.**

Puesto que *Chasmagnathus* vive en zonas salobres (10-14‰), se consideró como salinidad estándar a 12‰. Durante los experimentos de este Capítulo, los cangrejos fueron expuestos a condiciones más controladas de salinidad (2.5, 12 o 33‰). Se ubicaron sólo 20 animales en los **tanques de exposición**, consistentes en recipientes similares en tamaño a los tanques colectivos pero cerrados, con 2 litros de agua renovados diariamente, y salinidad controlada mediante densitometría óptica.

## **5.3 La exposición a la alta salinidad aumenta el nivel de las angiotensinas del cerebro.**

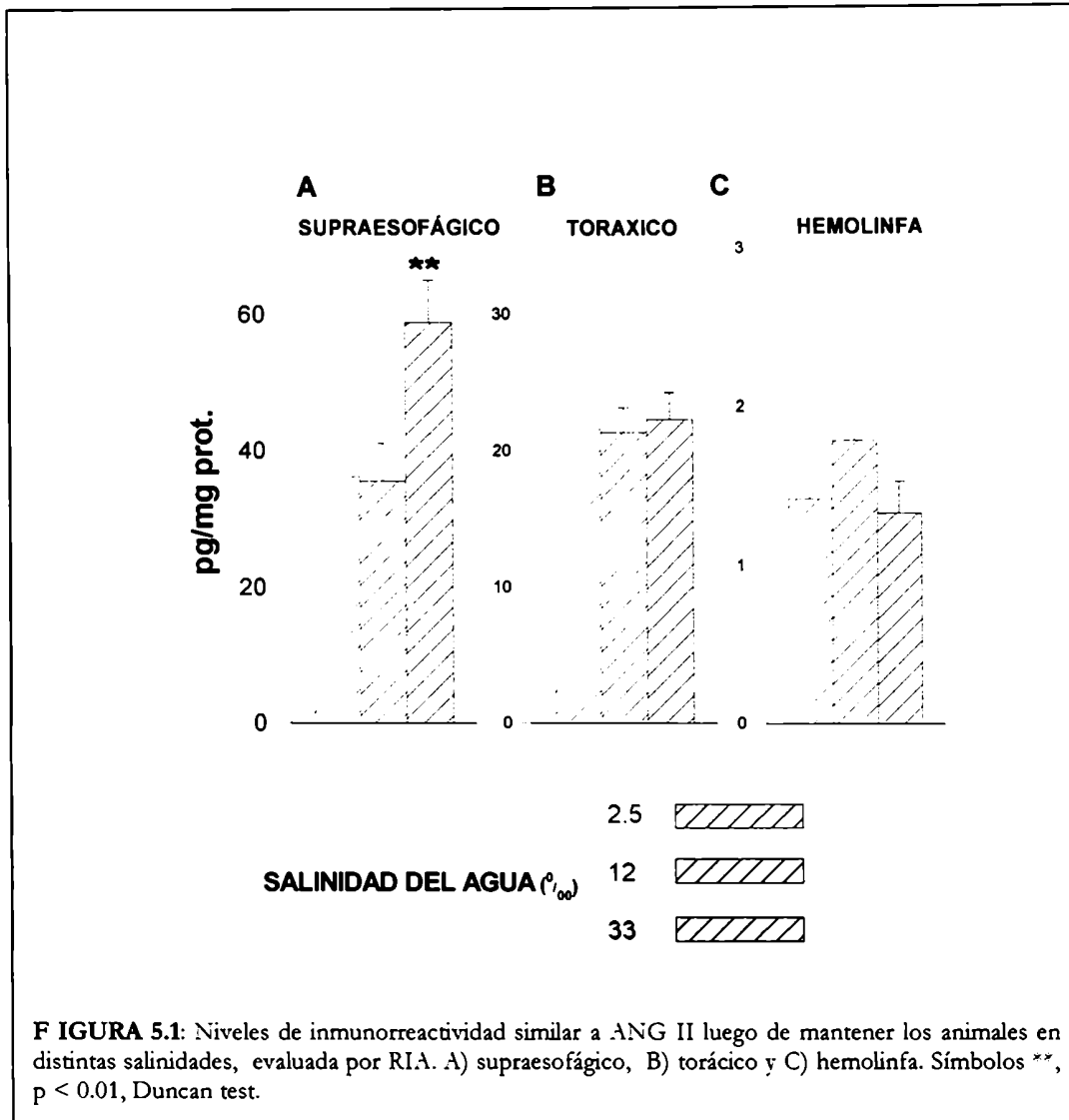
Con el fin de evaluar si la exposición de los animales a medios con diferentes niveles de salinidad alteran los niveles de angiotensina, tres grupos de 50 animales cada uno, fueron colocados por seis días en tanques de exposición con agua de diversas salinidades (2,5, 12 ó 33‰).

	TANQUES DE EXPOSICIÓN	
Grupos	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	SALINIDAD DEL MEDIO
2.5	6 días	2.5 ‰
12	6 días	12 ‰
33	6 días	33‰

Después de los 6 días, el nivel de inmunorreactividad similar a ANGII en hemolinfa, cerebro y ganglio torácico de *Chasmagnathus* es estimado por RIA. La razón para elegir tal período de la exposición es que un choque osmótico como el debido al cambio de la salinidad en los grupos 2,5 o 33‰, induce oscilaciones amplias en osmolaridad de la sangre en las primeras horas, recuperando el valor constante luego de horas a días según la especie de cangrejo (Bromberg, 1995; Pequeux, 1995). Específicamente, se sabe que *Chasmagnathus* recupera su nivel constante de sodio en hemolinfa dentro de los 6 días de exposición a un medio de salinidad más alta o baja de 12 ‰, i.e. a 2.5, 33 ó 45 ‰ (Luquet, 1992).

Los resultados de este experimento se exhiben en la Fig. 5.1. El nivel de inmunorreactividad en el cerebro (ganglio supraesofágico) fue notablemente más alto para el grupo 33 que para el 2,5 o 12 ‰ [ANOVA de una vía:  $F(3,13): 5,53$ ,  $p < 0,019$ ; Prueba de Duncan:  $p < 0,01$ ], mientras que no se pudo ver ninguna diferencia entre los grupos cuando se compararon los niveles del péptido en el ganglio torácico o en hemolinfa.

Así, la permanencia en un medioambiente de alta salinidad durante un período de tiempo en el cual los animales recuperan por completo la osmolaridad de la hemolinfa, se correlaciona con un aumento en el nivel de material inmunorreactivo similar a ANG II en el cerebro.



#### 5.4 La exposición a la alta salinidad facilita la memoria en *Chasmagnathus*.

Conforme con los resultados precedentes y con el hecho que ANG II inyectada inmediatamente después de un entrenamiento débil facilita la MCS, otra predicción de nuestra hipótesis es que la alta salinidad inducirá una facilitación de la memoria.

Dos experimentos fueron realizados con el propósito de poner a prueba esta predicción.

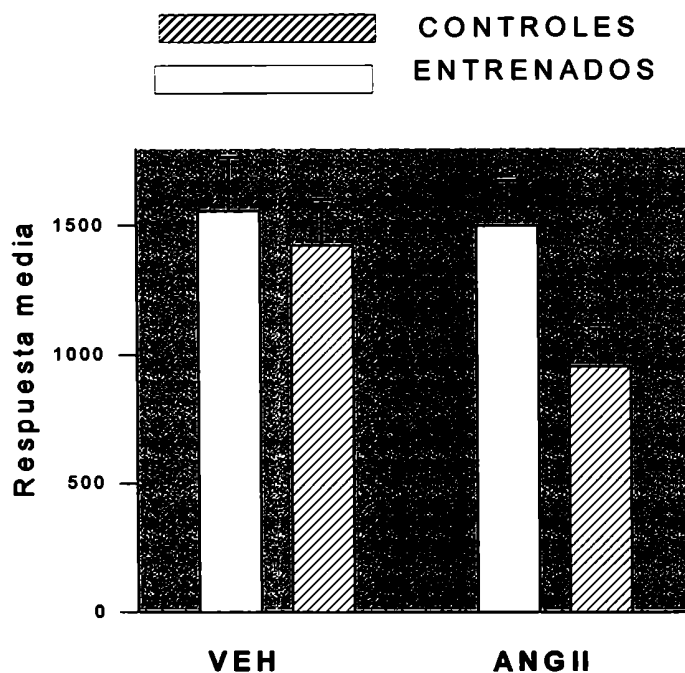
En uno de ellos, dos grupos CT-TR de cangrejos fueron expuestos por seis días en los **tanques de exposición**, luego sometidos a un protocolo de entrenamiento débil en los actómetros (7 ensayos separados por 171 seg.),

alojados en los contenedores individuales por 24 h y retornados a los actómetros para la evaluación (dos ensayos). Durante todo esta fase, la salinidad del agua fue de 12‰. Inmediatamente después del entrenamiento, un par CT-TR fue inyectado con solución salina y otro par con ANG II (50 pmoles). La siguiente tabla resume los grupos:

Pares de grupos CT-TR	TANQUES DE EXPOSICIÓN		ACTÓMETROS	TANQUES INDIVIDUALES	ACTÓMETROS
	EXPOSICIÓN	SALINIDAD	ENTRENAMIENTO		EVALUACIÓN
VEH	6 DÍAS	12 ‰	7 ENSAYOS	24 h	2 ENSAYOS
ANGII	6 DÍAS	12 ‰	7 ENSAYOS	24 h	2 ENSAYOS

Los resultados que corresponden a los dos ensayos de evaluación mostraron una diferencia en el par ANGII, i.e. ANGII-CT vs. ANG-TR, pero no en el par VEH, i.e. VEH-CT vs. VEH-TR (Fig.5.2). Las comparaciones planeadas revelaron una diferencia significativa entre CT y TR de ANGII [ $F(1.96) = 5.2$ ,  $p < 0.05$ ] pero no entre grupos salinos ni entre los grupos control. Así, el efecto facilitador de ANGII sobre la MCS también se puede revelar después de una larga estancia en un tanque con 2 lt de agua cuya salinidad fue de 12‰.



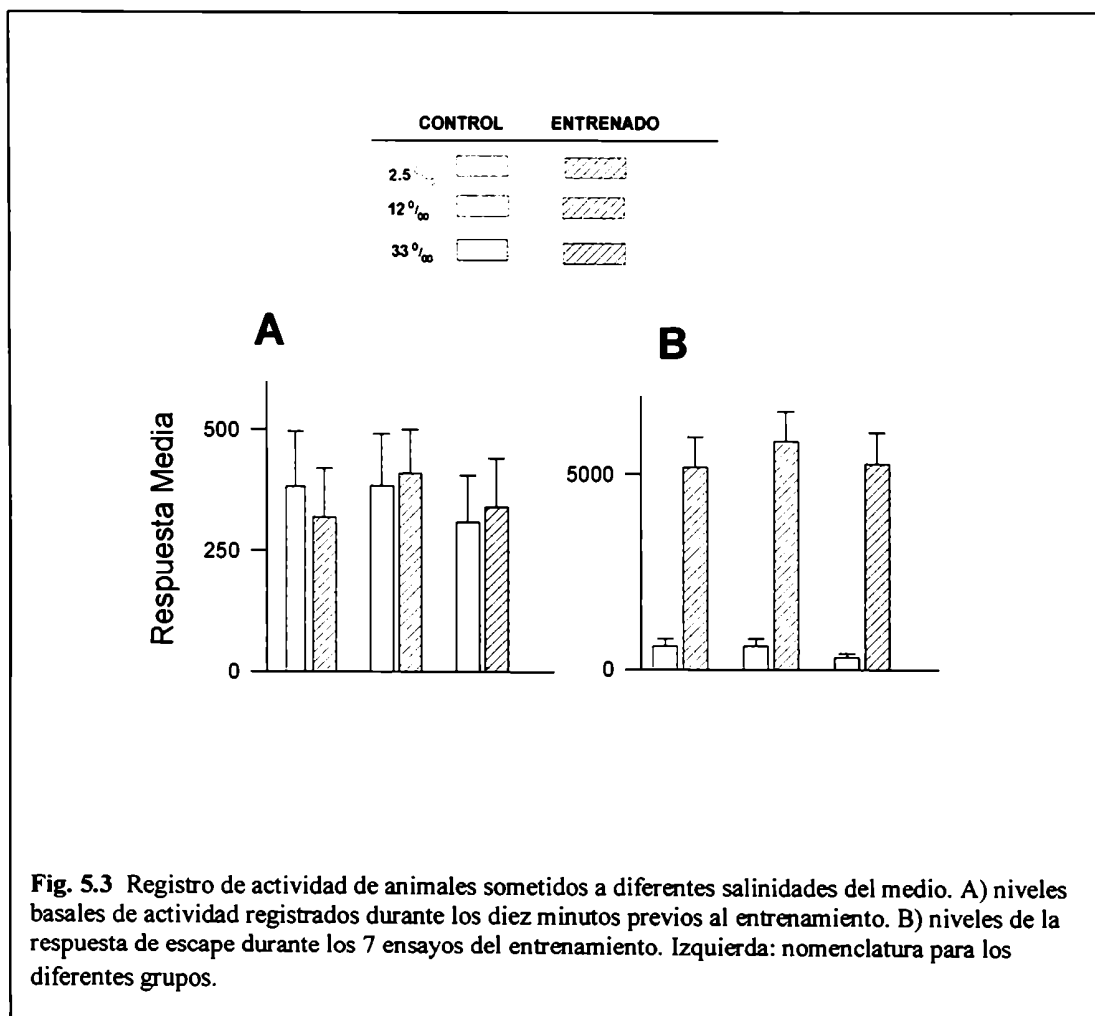


**FIGURA 5.2:** Efecto de la inyección de ANGII, administrada inmediatamente después de un protocolo de entrenamiento débil horas (5 ensayos separados por 171 seg.), sobre la MCS evaluada 24 h después del entrenamiento, utilizando animales mantenidos en tanques de exposición a 12‰. Sesión de evaluación de 2 ensayos. Animales inyectados con solución fisiológica de crustáceos (VEH), con 50 pmol de ANGII (ANGII). Símbolos como Fig. 4.2.

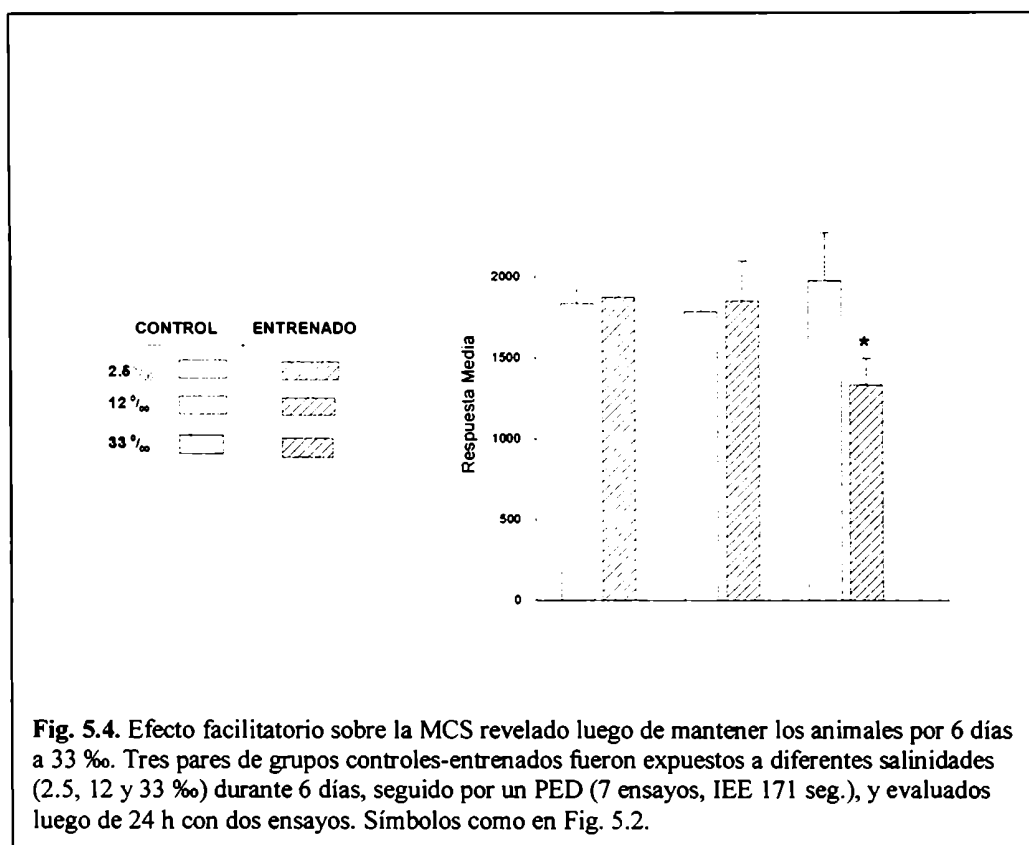
Un segundo experimento incluyó tres pares CT-TR mantenidos en diferentes salinidades, a saber, 2,5, 12,0 o 33,0‰, durante 6 días en los tanques de exposición, un protocolo de entrenamiento débil (7 ensayos) y dos ensayos de evaluación. La salinidad de cada grupo se mantuvo durante todas las fases del experimento. Ningún grupo fue inyectado.

Pares de grupos CT-TR	TANQUES DE EXPOSICIÓN		ACTÓMETROS	TANQUES INDIVIDUALES	ACTÓMETROS
	EXPOSICIÓN	SALINIDAD	ENTRENAMIENTO	24 h	EVALUACIÓN
2.5	6 DÍAS	2.5 ‰	7 ENSAYOS	2.5 ‰	2 ENSAYOS
12	6 DÍAS	12 ‰	7 ENSAYOS	12 ‰	2 ENSAYOS
33	6 DÍAS	33 ‰	7 ENSAYOS	33 ‰	2 ENSAYOS

Como se ve en la Fig. 5.3.A, no hubo diferencias entre los grupos en el nivel de actividad durante un período de 10 minutos previos al inicio de la sesión de entrenamiento, ni en nivel de la respuesta de los grupos TR durante los siete ensayos del mismo (Fig. 5.3 B), indicando así que las diferencias en la salinidad medioambiental no tienen ningún efecto en los niveles de actividad ni respuesta.



Sin embargo, los resultados que correspondieron a la sesión de evaluación del bloque de 2 ensayos, llevada a cabo 24 h después del entrenamiento, mostraron diferencias. Mientras que los cangrejos mantenidos en 2,5 o 12,0 ‰ no exhibieron diferencias entre los grupos entrenados y controles, la retención fue evidente para 33,0 ‰ (Fig. 5.4), [F (1.186) = 4,5,  $p < 0.05$ ]. Una retención robusta también fue obtenida usando una salinidad del medio de 45.0 ‰ en vez de 33.0 ‰ (datos no presentados).

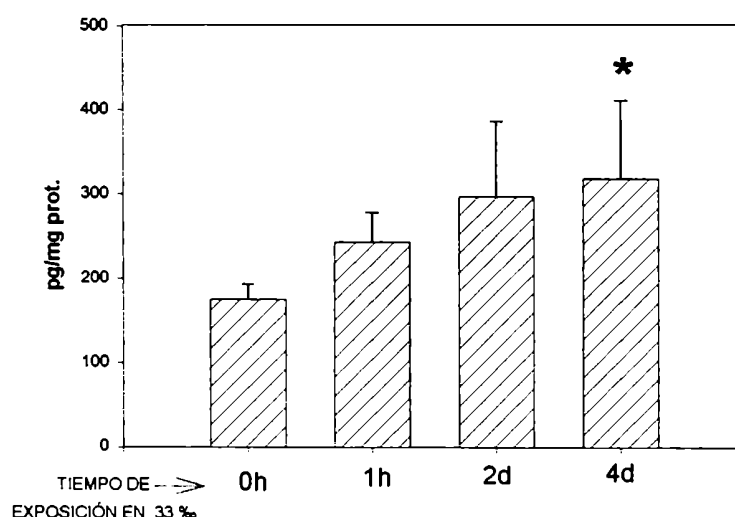


Por lo tanto, una cantidad escasa de entrenamiento (protocolo de entrenamiento débil) puede generar MCS tanto por la inyección de post-entrenamiento de ANG II como por haberse expuesto a los animales por 6 días a una salinidad de 33‰, es decir a un nivel elevado en comparación con su medioambiente natural (12‰).

### 5.5 El nivel de las angiotensinas del cerebro aumenta con la duración de la exposición a alta salinidad.

Los experimentos siguientes se realizan para evaluar los niveles de ANG II en el ganglio supraesofágico (cerebro) por períodos menores de seis días. Cuatro grupos de 40 cangrejos cada uno, fueron colocados en tanques con diversos tiempos de exposición. Para un grupo, la salinidad era de 33‰ durante cuatro días después de haber sido trasladados desde los tanques colectivos (agua salobre); para un segundo grupo, 12‰ durante los primeros dos días y 33‰ durante los dos días siguientes; para un tercer grupo, 12‰ durante cuatro días y transferidos a 33‰ durante una hora antes del entrenamiento; y para un cuarto grupo, la salinidad se mantuvo en 12‰ durante los cuatro días. Después de permanecer en los tanques de la exposición, el nivel de inmunorreactividad similar a ANGII es estimado en *pools* separados de 10 ganglios supraesofágicos (cuatro *pools* para cada grupo) mediante RIA.

Los resultados se exhiben en Fig. 5.5. Un examen de esta figura sugiere un aumento en el nivel de inmunorreactividad similar a ANG II en los cerebros a medida que aumenta la duración de la exposición a alta salinidad (33‰).



**Fig. 5.5.** Niveles de material inmunorreactivo similar a ANGII evaluado por RIA luego de mantener a los animales a 33 ‰ por 0 h, 1 h, 2 o 4 días. La inmunorreactividad fue evaluada por RIA en *pools* de 10 ganglios supraesofágicos (n=4). Tukey test de comparaciones múltiples; \*,  $p < 0.05$ .

Un ANOVA de una vía mostró un efecto principal significativo ( $F=3.56$ ,  $p=0.047$ ). Solamente el grupo expuesto por cuatro días en 33 ‰ mostró un nivel de inmunorreactividad estadísticamente más alto que el de cuatro días en 12 ‰ [ $p<0.04$ ; test de Tukey HSD].

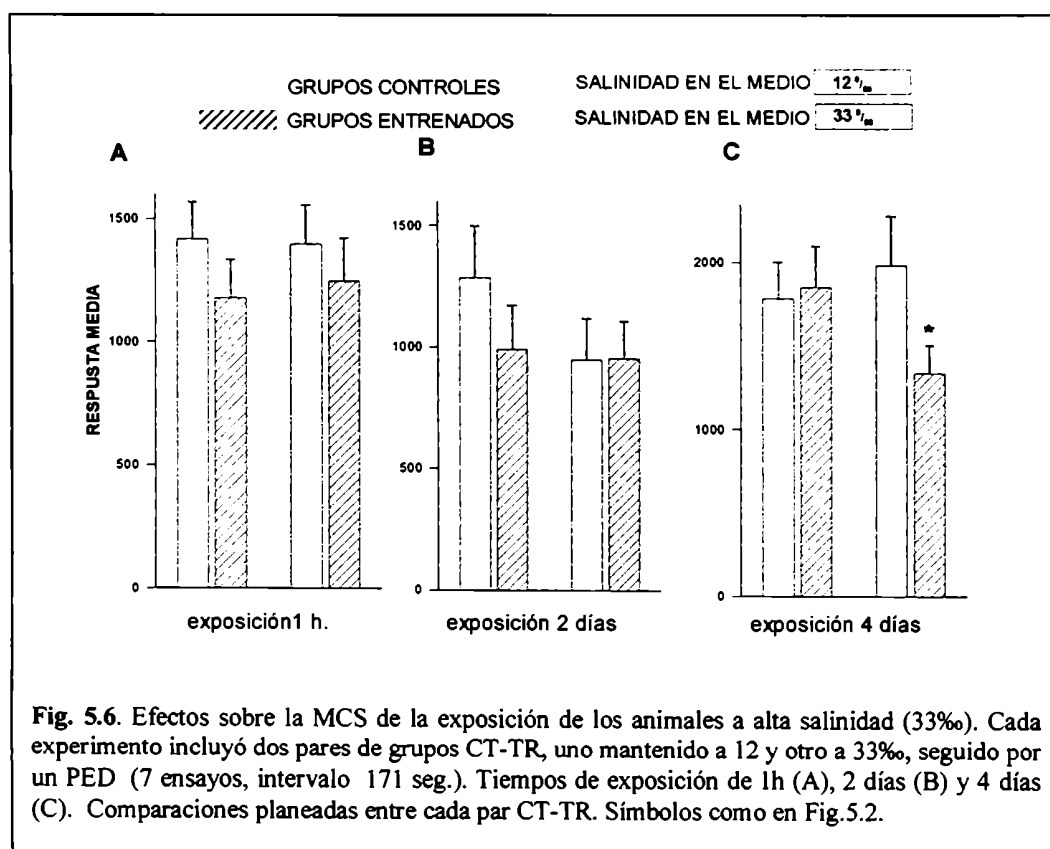
#### **5.6 La facilitación de la MCS depende de la duración de la exposición a alta salinidad y no es atribuible a estrés osmótico.**

Los resultados precedentes sugieren una relación funcional directa, mediada por las angiotensinas, entre alta salinidad y facilitación de la memoria. Sin embargo, la facilitación de la MCS podría explicarse en términos de estrés inducido por el cambio abrupto en salinidad del medio, ya que está bien documentada la influencia del estrés en diversos modelos de memoria (Cahill, 1996). Se sabe que un cambio en la salinidad medioambiental genera alteraciones en otras variables en cangrejos, que se consideran parte de las respuestas al estrés hiperosmótico; e.g. aumento de glucosa y de glicina-betaína (Nery, 1993). Tales síntomas del estrés osmótico se muestran más fuertemente durante las primeras horas después del cambio en la salinidad, desapareciendo totalmente luego de una semana.

Por lo tanto, si la facilitación de la memoria fuese atribuible al estrés, se esperaría que se manifieste nítidamente desde un período breve de exposición. Con el fin de explorar esta predicción, se hicieron tres experimentos, cada uno incluyendo dos grupos CT-TR: un par mantenido en los tanques de la exposición con 12,0 ‰ y otro con 33,0 ‰. En el Experimento 1, los animales permanecieron en los tanques por 1h; en el Experimento 2, por 2 días; y en el Experimento 3, por 4 días. No se administraron inyecciones en ningún experimento. Después de la estancia en los tanques de exposición, todos los grupos pasaron por las mismas fases: 7 ensayos de entrenamiento, 24 horas de intervalo entre sesiones, y dos ensayos de evaluación, manteniendo la misma salinidad.

EXPERI MENTO	PARES DE GRUPO S	TANQUES DE EXPOSICIÓN		ACTÓ- METROS	TANQUES INDIVIDUA- LES	ACTÓ- METROS
		EXPOSI- CIÓN	SALINIDAD	ENTRENA- MIENTO: Número de ensayos	24 h	EVALUA- CIÓN Número de ensayos
EXP 1	12-1h	1 hora	12 ‰	7	12 ‰	2
	33-1h	1 hora	33 ‰	7	33 ‰	2
EXP 2	12-2d	2 DIAS	12 ‰	7	12 ‰	2
	33-2d	2 DIAS	33 ‰	7	33 ‰	2
EXP 3	12-4d	4 DIAS	12 ‰	7	12 ‰	2
	33-4d	4 DIAS	33 ‰	7	33 ‰	2

Los resultados correspondientes al bloque de dos ensayos de evaluación se muestran en la Fig. 5.6. Las comparaciones revelaron que la única diferencia significativa corresponde al Experimento 3, es decir al par 33,0 ‰ CT-TR después 4 días [ $F(1,120) = 4.9, p < 0.05$ ] (Fig. 5.6 A).



Así, se observó retención después de 4 días en la salinidad mayor, pero no luego de 1 h o 2 días en 33,0‰, es decir después de un período de tiempo que podría suponerse de mayor estrés osmótico. Por lo tanto, estos resultados excluyen una explicación del efecto facilitador por estrés osmótico, sugiriendo que el efecto sobre la memoria sólo se hace manifiesto cuando la fase reguladora que sigue al choque osmótico se ha completado y, paralelamente, cuando el nivel de péptidos similares a ANGII alcanza el nivel más alto (Fig. 5.5).

### **5.7 La facilitación de la MCS tampoco puede ser explicada por mayor saliencia contextual**

Experimentos previos en el laboratorio demostraron que la MCS implica una asociación entre el contexto y la señal (Tomsic, 1998), refiriéndose principalmente a señales visuales de contexto. Sin embargo, si la salinidad medioambiental fuese también una señal contextual relevante, entonces debería esperarse que una salinidad más alta resultase en mayor saliencia del contexto y por ende en mayor adquisición y/o consolidación de la MCS. Consistente con esta suposición, se ha demostrado que la saliencias también son importantes en memorias asociativas en invertebrados (Pelz, 1997).

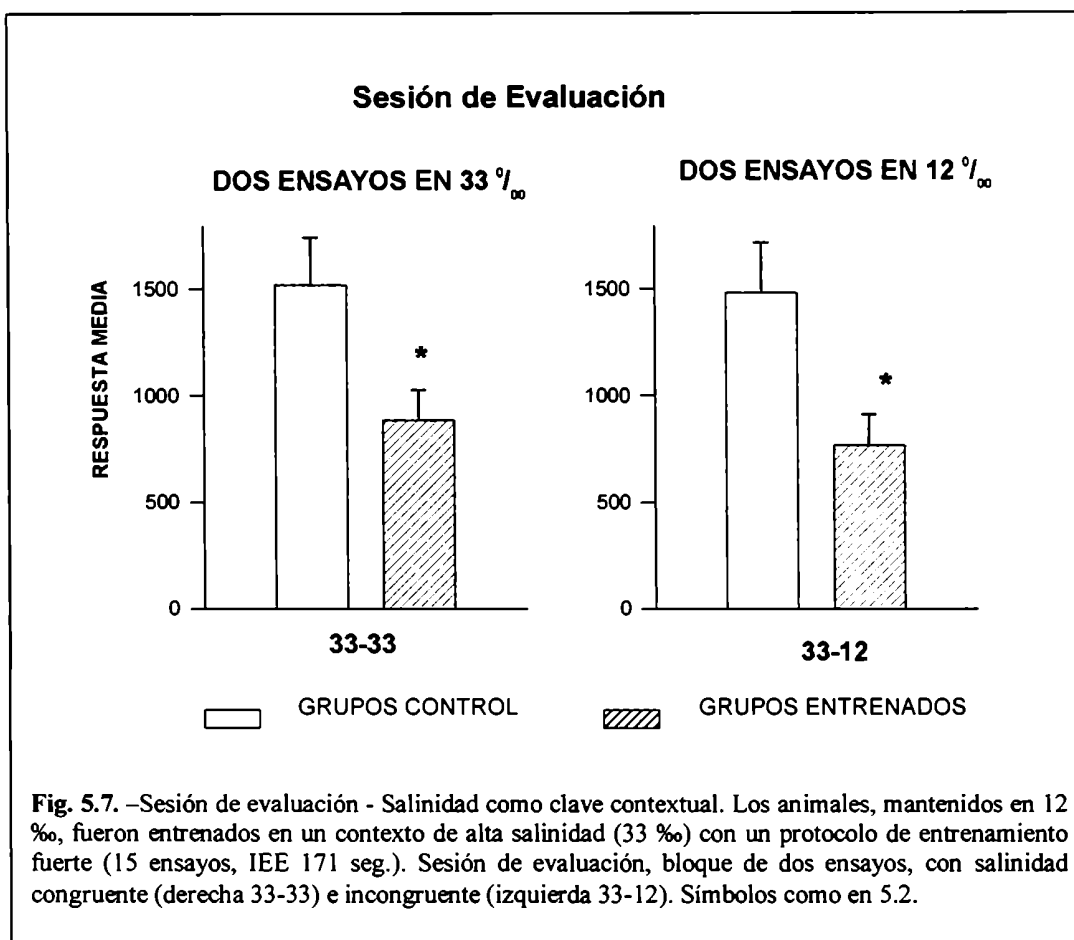
Con el fin de poner a prueba esta interpretación, se llevó a cabo un experimento que incluye un cambio de salinidad entre entrenamiento y evaluación. (Fig. 5.6). La hipótesis es que si la salinidad es importante como estímulo tónico contextual, una incongruencia entre entrenamiento-evaluación se reflejaría en una peor retención de la MCS.

Dos grupos de cangrejos que habían estado previamente en salinidad estándar 12 ‰ fueron colocados en actómetros conteniendo agua con salinidad de 33,0‰, donde recibieron 15 ensayos del entrenamiento para luego ser retornados a recipientes individuales de 12‰ por 24 h antes de la sesión de evaluación (grupos TR). Como en otros experimentos, se corrieron grupos controles (grupos CT). La mitad de los animales de cada grupo (TR y CT) fue evaluado en la misma salinidad en la que han sido entrenados, es decir en 33,0 ‰ (par 33-33) y el resto (par 33-12) en 12,0‰.

PARES DE GRUPOS	TANQUES DE EXPOSICIÓN	SALINIDAD EN ACTOMETROS	TANQUES INDIVIDUALES	SALINIDAD EN ACTÓMETROS
	SALINIDAD	ENTRENAMIENTO	24 h	EVALUACIÓN
33-33	12 ‰	7 ENSAYOS 33 ‰	12 ‰	2 ENSAYOS 33 ‰
33-12	12 ‰	7 ENSAYOS 33 ‰	12 ‰	2 ENSAYOS 12 ‰

Ninguna diferencia fue detectada durante el entrenamiento (datos no presentados). Por el contrario, hubo una diferencia significativa entre CT y TR durante la evaluación tanto para el par 33-12 (Fig. 5.7) [ $F(1,114) = 8.11$ ,  $p < 0.01$ ] como para el par 33-33 [ $F(1,114) = 5.12$ ,  $p < 0.05$ ]. Por lo tanto, el cambio de salinidad no deteriora la MCS, contradiciendo la suposición que la salinidad del medio es un estímulo tónico contextual de gran saliencia. Este resultado, junto al hecho que un protocolo de entrenamiento débil precedido por la pre-exposición a alta salinidad por períodos de dos días o una hora no producen MCS, hace inviable la explicación alternativa propuesta.





### **Conclusiones del Capítulo 5**

La permanencia en un medio de la alta salinidad por un período de tiempo en el cual se espera esté recuperada por completo la osmolaridad de la hemolinfa, se correlaciona con un aumento en el nivel de las angiotensinas en el cerebro y con un incremento en la capacidad de memoria. Estos resultados, junto con la demostración que la administración exógena de ANG II tiene un evidente efecto facilitador de la memoria, abren la posibilidad de que exista una conexión funcional entre la regulación del balance de fluidos corporales y la modulación de la memoria, mediada al menos en parte, por una acción de las angiotensinas. Este esquema se discutirá en el capítulo siguiente donde se integrarán todos los resultados de esta Tesis.

Cabe recordar que en crustáceos, existen numerosos datos acerca de los efectos fisiológicos sobre procesos osmorregulatorios usando homogenatos provenientes de ganglio ópticos, supraesofágicos y torácicos, pero poco es conocido acerca de cuales son los neuromoduladores/neurohormonas específicos, salvo para las aminas (McNamara, 1991; Kamemoto, 1991, (Mantel, 1986; Fingerman, 1997). En este mismo sentido, se ha descrito en decápodos de agua dulce expuestos por más de seis días a agua de mar un aumento en la actividad neurosecretoria en neuropilos anteromediales protocerebrales (McNamara, 1993). En este neuropilo se encontró inmunorreactividad positiva a ANG II en *Chasmagnathus* (Fig. 3.3). Mientras que no hemos detectado cambios, en el ganglio torácico y en hemolinfa, en la cantidad de inmunorreactividad similar a ANG II, sí lo vimos en el supraesofágico luego de exposiciones a un medio ambiente de alta salinidad de 4 o 6 días, y probablemente antes.

Como se expuso en la Introducción (Introducción, 1.9.6), peces eurihalinos muestran altos niveles de ANG II centrales cuando son mantenidos en agua de mar por 24 h o más, en comparación con aquéllos que están adaptados a aguas salobres (Galli, 1996). La capacidad de ANGII de incrementar la ingesta de agua, es uno de los mecanismos adaptativos básicos para la aclimatación al agua de mar (Fuentes, 1997). Phillips (Galli, 1996) plantea la posibilidad de un mecanismo de ying y yang entre los niveles centrales del factor natriurético atrial en peces y ANGII; además del aumento de CNP central en animales mantenidos en aguas salobres, se detecta una caída en los niveles de este péptido en plasma. Este dato es importante, ya que Turrin (Turrin, 1992) describió un aumento, estimado por RIA, en los niveles de inmunorreactividad similar a ANP en hemolinfa de cangrejos que son sometidos a medio ambientes de alta salinidad, sugiriendo que este péptido tiene también en crustáceos un papel osmorregulador. Este antecedente está en concordancia con la noción que varios de estos mecanismos hayan aparecido tempranamente en la evolución, abriendo así la posibilidad que este mecanismo ying-yang de ANG II-ANP esté también presente en crustáceos.

## **Capítulo 6**

### **Discusión general y conclusiones**

## **6.1 Presencia de neuropéptidos similares a ANG II en el SNC de Chasmagnathus e inferencias acerca de sus posibles funciones.**

### **6.1.1 Presencia.**

Como un primer paso en esta Tesis, se han descrito y/o localizado algunos de los componentes del sistema angiotensinérgico.

Se encontró material inmunorreactivo similar a ANG II, mediante RIA, en hemolinfa, hepatopáncreas, branquias, ganglios torácico y supraesofágico; además, se describió actividad similar a la enzima convertidora de angiotensina en ganglio torácico y branquias.

Mediante inmunohistoquímica se detectó inmunorreactividad similar a ANG II en: a) médula externa y lámina ganglionaris, identificando cuerpos neuronales inmunorreactivos (Figura 3.2), tratándose de tipos neuronales no descritos previamente (Nässel, 1977; Strausfeld, 1980); b) procesos neuronales en neuropilos del ganglio supraesofágico, protocerebro antero medial y lóbulo olfatorio (Fig. 3.4). Además, revelamos una fuerte reactividad en la glándula del seno, aunque sin poder identificar el origen de los axones (Fig. 3.4).

Estos resultados constituyen la primera evidencia de la presencia de angiotensinas en todo el phylum de artrópodos, teniendo en cuenta que si bien en insectos se había definido actividad similar a enzima convertidora de angiotensina y se había clonado el gen respectivo, esta enzima tiene actividad sobre múltiples sustratos (Introducción, 1.9.7). Los resultados bioquímicos de esta Tesis, junto con el hecho que angiotensina I y renina se secuenciaron en sanguijuelas (Laurent, 1996a; Salzert, 1997) y que, también, se ha sugerido una acción osmorreguladora en poliquetos (Fewou, 1995), apoyan la hipótesis que el sistema de las angiotensinas surgió tempranamente en la evolución.

Como se dijo en la Introducción (Introducción, 1.3.2), la presencia de un sistema peptidérgico que surge tempranamente y es conservado en la evolución animal, no es una excepción, siendo la familia vasopresina-oxitocina otro buen ejemplo. Miembros de esta familia han sido secuenciados y clonados en invertebrados. Así, la conopresina, se ha descrito como neurotransmisor/neuromodulador tanto en el SNC como en órganos reproductores de moluscos (Van Kesteren, 1995) y, la anetocina, un péptido

de la familia de oxitocina, se ha identificado en anélidos, además de dos receptores para este péptido (Satake, 1999).

### 6.1.2 Inferencias sobre funciones.

Existen argumentos para pensar que las zonas del SN de *Chasmagnathus* en las que hemos mostrado inmunorreactividad podrían estar involucradas en algunas de las etapas del proceso mnésico bajo estudio.

#### a) *Lámina y médula externa:*

Wiersma (Wiersma, 1982) considera que los procesos neuronales de la *lámina y médula externa* y sus respectivos cuerpos neuronales, actúan en el procesamiento de la información relacionada con la habituación a estímulos visuales. Componentes de la médula externa y la lámina han sido muy estudiados en el procesamiento de señales visuales en decápodos (Glantz, 1983, 1995, 1998a y b; Wiersma, 1982) y según algunos autores estas estructuras pueden considerarse como parte del sistema visual (Nässel, 1977). Dado que se ha detectado inmunorreactividad similar a ANG II en éstas áreas (Fig.3) y que tanto la MCS como la MS se basan en información de tipo visual, es posible especular que la función mnésica de este sistema peptidérgico en *Chasmagnathus* se ejecuta ya a este nivel inicial del procesamiento de la información visual. Otros neuropéptidos, presentes también en vertebrados, han sido también descriptos en *lámina y médula externa*, e. g. sustancia P y encefalinas (Mancillas, 1981; Fingerman, 1997), pero no hay ninguna evidencia acerca de sus funciones.

La presencia, y posible función, de angiotensinas en áreas involucradas en la integración de estímulos visuales es un hecho conocido en vertebrados. Las angiotensinas están presentes en el colículo superior y modulan la excitación neuronal provocada por estímulos visuales en ésta área (Michels, 1994; Marabet, 1997). Además, el SRA está involucrado en vías de neurotransmisión retinales en humanos (Jurklics, 1995) y se encuentra en áreas del SNC que integran información visual en aves (Medina, 1998).

### b) *Protocerebro*

Respecto a la presencia de inmunorreactividad similar a ANGII en el neuropilo *protocerebral anteromedial* y el *lóbulo olfatorio* de *Chasmagnathus* (Fig. 3.4), se ha propuesto que estas estructuras están implicadas en procesos de integración visual y olfatoria (Nässel, 1987). Sandeman (Sandeman, 1992) las propone como lugares de integración o asociación, ya que no se ha podido relacionarlas con alguna aferencia primaria. Finalmente, si bien los lóbulos olfatorios reciben aferencias de la los pelos quimiorreceptores de la primera anténula, se los considera también un área de asociación por inferencia de los resultados obtenidos en otros artrópodos, i.e. la abeja (Menzel, 1996).

Dentro de este marco es importante notar que camarones expuestos a alta salinidad, presentan un aumento de la actividad neurosecretoria en los neuropilos anteromediales (ganglio supraesofágico) (McNamara, 1993), área inmunorreactiva para los anticuerpos que usamos en *Chasmagnathus* (Fig.3.3).

### c) *Glándula del seno:*

Una mención especial merece la demostración de inmunorreactividad similar a ANG II en la *glándula del seno*, órgano neurohemal que forma junto al órgano X un complejo que produce y libera hacia la hemolinfa una serie de hormonas que, a la par de los órganos Y y mandibulares, regulan gran cantidad de las funciones en crustáceos, (Charmantier, 1994; Eckhardt, 1995). La presencia de las angiotensinas en este sistema, considerado homólogo al eje hipotálamo-hipófisis de los vertebrados (Cook, 1983), sugiere que estaría aquí uno de los orígenes de la ANGII circulante que hemos descripto en hemolinfa. En este sistema neuroendócrino se han descripto también otros neuropéptidos presentes en vertebrados, como vasopresina, vasotocina, oxitocina, MSH, FSH y LH (Fingerman, 1993).

Además, se sabe que la función osmorreguladora, está mediada por hormonas de naturaleza peptídica liberadas desde la glándula del seno, entre otros sitios de liberación (Pequex, 1995; Eckhardt, 1995; Kamemoto, 1991; Fingerman, 1997), aunque no se ha identificado específicamente al péptido involucrado. Puede considerarse que la presencia de péptidos similares a ANG

II en éste tejido, sugieren que las angiotensinas, liberadas a la hemolinfa desde la *glándula del seno*, regulan el movimiento de iones en decápodos.

#### b) *Branquias*

Otra sugerencia de que las angiotensinas pueden estar involucrados en procesos osmorregulatorios es la descripción de inmunorreactividad similar a ANGII y actividad similar a ECA en branquias (Capítulo 3). Este tejido juega un papel preponderante en los procesos osmorreguladores, donde la mayoría de los parámetros que regulan la permeabilidad al agua e iones son afectados durante estos procesos (Charmantier, 1994) y, además, es uno de los principales órganos blanco de las hormonas involucradas en dichos procesos en crustáceos (Kamemoto, 1991). La presencia de componentes del sistema angiotensinérgico en este tejido favorecen la hipótesis que estos péptidos actúen sobre las branquias, probablemente alterando las permeabilidades, a corto y largo plazo, como lo hacen en sistemas excretores de vertebrados (Liu, 1987).

Además, en un cangrejo eurihalino que comparte el hábitat con *Chasmagnathus*, *Uca Uruguayensis*, se han descrito cambios morfológicos en branquias de animales expuestos a agua de mar que implican adaptaciones a ese ambiente (Luquet, 1997). Dado que ANG II es considerado como factor trófico en vertebrados, tanto en neuronas como en varios tejidos periféricos (Blume, 1999; Hilgers, 1998), este péptido podría estar involucrado en algunos de los cambios descritos anteriormente.

#### **6.2.- Acciones mnésicas de angiotensinas en *Chasmagnathus*.**

Los trabajos farmacológicos de esta Tesis apoyan la idea de que neuropéptidos similares a ANG II son **facilitadores endógenos** de procesos mnésicos, ya que cumplen con la mayoría de las **condiciones** propuestas por De Wied (De Wied, 1997), a saber:

1- están presentes en áreas **probablemente** involucradas en procesos de memoria, como se discutió en el punto anterior sobre la base de los datos del Capítulo 3.

2- su acción facilitadora es dosis y tiempo dependiente. Los efectos hipermnésicos por aporte exógeno desaparecen cuando se administran una hora después del entrenamiento (Capítulo 4).

3- el bloqueo de la actividad de péptidos endógenos, mediante antagonistas de ANG II, provoca efectos amnésicos que también son tiempo-dependientes (Capítulo 4).

Conforme a las condiciones propuestas por De Wied (De Wied, 1997) faltarían dos para definir a ANG II como un facilitador endógeno. En primer lugar, sería necesario demostrar que neuronas de *Chasmagnathus* son capaces de liberar ANG II y que ésta sería capaz de alterar la excitabilidad neuronal. Sin embargo, la descripción de fibras y somas inmunorreactivos para un anticuerpo contra ANG II en el cerebro del cangrejo (Capítulo 3) parecen apoyar fuertemente la idea de que estas neuronas liberarían este neuropéptido. En segundo lugar, deberían identificarse receptores en áreas involucradas en estos procesos mnésicos.

Otra de las características de un sistema modulador mnésico es que sea capaz de influir diversos procesos de memoria (Cahill, 1996). En conformidad con este criterio se ha demostrado que el antagonista de ANG II, SAR, es capaz de bloquear tanto un aprendizaje asociativo (MCS) como uno no asociativo (MS) (Capítulo 4).

La posibilidad de que esta acción moduladora positiva sea inespecífica, es decir que se deba a efectos sobre estados motivacionales, percepción ó atención, parece excluida por el hecho de que no se reveló ninguna diferencia entre grupos controles ni alteraciones en la respuesta, cuando las drogas fueron administradas antes del entrenamiento.

Nuestros experimentos soportan la hipótesis de que ANG II endógena, y no ANG IV, tiene un papel facilitador en la MCS. Es interesante destacar que estos resultados en *Chasmagnathus* contrastan con los varios experimentos en roedores señalando que la ANG IV, a través de su receptor AT4, tiene una acción hipermnésica, ya que agonistas de AT4 facilitan la memoria mientras que un antagonista muestra efectos amnésicos (Wright, 1997, 1999). No obstante, existe hoy una controversia frente a los verdaderos ligandos del receptor AT4 en vertebrados. Algunos autores consideran que el verdadero ligando es un metabolito activo de las angiotensinas, ANG IV, mientras otros



sugieren que es un fragmento de globinas beta-a y beta-b. La distribución de receptores específicos para este fragmento es idéntica a la de ANG IV y, además, el fragmento de globina produce internalización de receptores AT4 mientras que la ANG IV no tiene este efecto (Moeller, 1997, 1999).

Los resultados de esta Tesis sugieren que los efectos debidos a la administración de ANG II no se deben a su acción sobre el receptor de ANG IV. Igualmente, no se pudo observar que alguno de los efectos provocados por la administración de ANG II en mamíferos, tanto de manera central como periférica, sea mediado por AT4 (Wright, 1997).

En nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que tiene como tema de investigación el papel de los neuropéptidos en procesos de memoria utilizando como modelo un invertebrado.

### 6.3.- Papel funcional del efecto de las angiotensinas sobre la memoria en *Chasmagnathus*: un disparador endógeno del efecto mnésico de las angiotensinas.

Como se discutió en la Introducción, es muy frecuente que a un mismo neuropéptido se le atribuyan diversas funciones, siendo un ejemplo típico, justamente, el de las angiotensinas. Existen al menos dos maneras distintas de considerar esta complejidad de acciones.

Conforme a **una primera visión**, los neuropéptidos evolucionaron bajo diferentes presiones selectivas en varios canales de información. Con la creciente demanda que involucró un aumento en la complejidad de los animales, los péptidos modificaron su función a través de la evolución y/o adquirieron múltiples funciones en una misma especie (Mayers, 1991). La multiplicidad de funciones sería necesariamente el resultado de una estrategia conservadora del proceso evolutivo. Así, una gran variedad de funciones especializadas pueden ser descriptas para las vasopresinas en el sistema nervioso, desde animales muy primitivos y en taxones muy diversos, por ejemplo, actuando como hormona neurohipofisiaria en mamíferos y como veneno en *Conus* (Satake, 1999). Este punto de vista concuerda perfectamente con el planteo de Nicholls que mencionamos en la Introducción (Nicholls, 1994).

De acuerdo a **una segunda visión** que contrasta con la primera, las diversas acciones de un mismo neuropéptido deben ser colocadas dentro de un esquema de relaciones funcionales y secuencia de eventos. La multiplicidad de funciones que un neuropéptido muestra en una misma especie, estarían **coordinadas** entre sí y **articuladas** de manera tal de producir una respuesta adaptativa ante un cambio ambiental (Kravitz, 1989). De aquí surge la idea de considerar a un neuromodulador como un “orquestador”, es decir como una señal química que a través de diversas modificaciones en la actividad del sistema nervioso central o periférico, ó en el nivel metabólico, conduce al animal a una rutina comportamental coherente frente a un cambio en el ambiente (Kravitz, 1978; Edwards, 1999; Bicker, 1989; Sombati, 1984)

Conforme a esta idea, Wright (Wright, 1994) planteó su esquema especulativo acerca de la acción mediadora de las angiotensinas ante una disminución en la disponibilidad de agua (Introducción, 1.1). Otro ejemplo de esta manera de pensar lo da Morley con respecto a la acción de las endorfinas, tanto en vertebrados como en invertebrados, en la coordinación de acciones fisiológicas y comportamentales dirigidas a la obtención de alimentos y a asegurar la eficiencia de los procesos metabólicos relacionados con la alimentación (Morley, Flood, 1987; Morley, 1983, 1995, 1986, 1995; Terenius, 1992).

Basándonos en el segundo modelo interpretativo, tratamos de interpretar los resultados del Capítulo 5, según los cuales **la permanencia en un medio de alta salinidad se correlaciona con un aumento en el nivel de las angiotensinas en el cerebro y con un incremento en la capacidad de almacenar la memoria.**

La población de *Chasmagnathus* con la que trabajamos vive en zonas intertidales con aguas salobres (10-14‰), pero excepcional y transitoriamente habita un medioambiente de ‰ 33,0 (D'incao, 1992). De ahí entonces que sea tentador considerar que este medio representa para *Chasmagnathus* un desafío que activaría mecanismos angiotensinérgicos diversos. Un incremento en el contenido de sal del agua provocaría un aumento en los niveles de angiotensinas en el cerebro. La alteración en el contenido de angiotensinas induciría, a su vez, acciones destinadas a rectificar el contenido de agua y sodio en sangre, así como cambios comportamentales que incluirían un aumento en la capacidad de adquisición y/o consolidación de memoria, permitiendo al cangrejo una respuesta más eficiente ante la amenaza de un predador.

Las angiotensinas actuarían entonces como *“orquestadores/organizadores que coordinan un conjunto de acciones fisiológicas y comportamientos tendientes a asegurar una respuesta altamente adaptativa frente a cambios en las condiciones hídricas del medio ambiente”*.

Consideramos que esta Tesis constituye el primer trabajo empírico que apoya el esquema teórico sugerido por Wright y otros autores acerca de la función orquestadora de las angiotensinas (Wright, 1994, Fitzsimons, 1998).

#### 6.4 Antigüedad de los neuropéptidos y antigüedad de sus funciones.

Los resultados de esta Tesis sugieren no solo que péptidos similares a las angiotensinas están muy conservados a lo largo de la evolución, si no, también, que su doble función como osmoreguladores y moduladores de la memoria, aparece ya tempranamente en la historia evolutiva.

Esta persistencia de la relación neuropéptido-función no se compadece con la idea de un neuropéptido con diversidad de funciones como resultado de la estrategia conservadora de la evolución, y por lo tanto, sin relaciones de esas funciones entre sí. Contrariamente, la persistencia de la relación neuropéptido-función es compatible con el modelo que concibe a estos compuestos jugando el papel de orquestadores de funciones diversas.

No sabemos cuán frecuentes pueden ser los ejemplos de la conservación de funciones para un neuropéptido. Podemos mencionar como ejemplos, además del papel de las angiotensinas en la regulación del equilibrio hídrico y la memoria, la función de opiáceos endógenos en la alimentación (Morley, 1995) o de la insulina en la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono (Floyd, 1999). Cabe advertir que los invertebrados no son al presente buenos candidatos para este tipo de estudio, ya que hay una notable carencia de investigaciones acerca de las acciones de los neuropéptidos en funciones integradoras del sistema nervioso central (*higher brain functions*) (Nassel, 1996). Sin embargo, como se ha visto a lo largo de esta Tesis, *Chasmagnathus* ofrece una posibilidad única de explorar la persistencia de la relación neuropéptido-función en cuanto a las funciones integradoras del sistema nervioso central.

## Bibliografía

- Abbott J. Absence of blood-brain barrier in a crustacean, *Carcinus maenas*. *Nature*, 17 (225): 291-293, 1970.
- Alberch D, Briser M and Kruger H. Excitatory of angiotensins II and IV on hippocampal neuronal activity in urethane anesthetized rats. *Regul. Pept.* 70 (2-3): 105-109, 1997.
- Alkon DL. Calcium-mediated reduction of ionic currents: a biophysical memory trace. *Science*, 226: 1037-1045, 1984.
- Amouyel P, Richrad F, Cottel D, Amant C, Codron V, Helbecque N. The deletion allele of angiotensin I converting enzyme gene as genetic susceptibility for cognitive impairment. *Neurosci Lett*, 217: 203-205, 1996.
- Applewhite BP, Gadner FT, Lapan E. Physiology of habituation learning in a protozoan. *Transactions of the NY Acad. of Sci.* 31: 842-849, 1969.
- Bains JS, Ferguson AV. Paraventricular nucleus neurons projecting to the spinal cord receive excitatory input from the subfornical organ. *Am J Physiol*, 268 (3 Pt 2): R625-633, 1985.
- Balment RJ, Carri S. Endogenous renin-angiotensin system and drinking behaviour in flounder. *Am. J Physiol*, 239: R157-160, 1985.
- Bank B, Nelson T, Alkon DL. Molecular mechanisms of associative learning in mammal and mollusc. *J Physiol (Paris)*, 83(3): 119-125, 1988-89.
- Baranowska D, Braszco JJ, Wisniewski K. Effect of angiotensin II and vasopressin on acquisition and extinction of conditioned avoidance in rats. *Psychopharmacol*, 81: 247-251, 1983.
- Baratti CM, Faiman CP, de Erausquin GA. Facilitation of inhibitory avoidance by hypertonic saline is reversed by a vasopressin and a nicotinic antagonist. *Behav Neural Biol*, 51(3): 424-435, 1989.
- Barnes NM, Costall B, Kelly ME, Murphy DA, Naylor RJ. Anxiolytic-like action of Dup 753, a non-peptide angiotensin II receptor antagonist. *Neuroreport*, 1: 20-21, 1990.
- Beltz BS. Crustacean Neurohormons. In *Endocrinology of Selected Invertebrates Types*, pp 235-258, Alan R. Liss Inc, 1988.
- Ben-Ari, ET, Garrison, JC. Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. *Am. J Physiol*, 255: E70-79, 1988.
- Bernabeu R, Bevilacqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (13): 7041-7046, 1997.
- Beron de Astrada M, Maldonado H. Two related forms of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav*, 63 (1): 109-118, 1999.
- Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Thomas WG, Conrad KM, Baker KM. Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT1A receptor activates transcription factor-Stat91 and/or a related protein. *J Biol Chem* 269 (31): 443-449, 1994.
- Bicker, G, Menzel, R. Chemical codes for the control of behaviour in arthropods. *Nature*, 33: 33-39, 1989.
- Blaustein, DN, Derby CD, Simmons RB, Beall AC. Structure of the brain and medulla terminalis of

the spiny lobsters *Panilargus argus* and the crayfish *Procambrus clarkii*, with an emphasis on the olfactory centers. *J Crustacean Biol*, 8: 493-519, 1988.

- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407): 31-39, 1993.
- Blomm FF. The functional significance of neurotransmitter diversity. *Am J Physiol*, 246: C184-194, 1984.
- Blume A, Herdegen T, Unger T. Angiotensin peptides and inducible transcription factors. *J Mol Med Mar*; 77(3): 339-357, 1999.
- Blundell, TL, Humbel, RE. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature*, 287: 781-786, 1980.
- Braszko J. The contribution of AT1 and AT2 angiotensin receptors to its cognitive effects. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 56: 49-54, 1996.
- Braszko JJ, Kulakowska A, Winnicka MM, Karwowska-Polecka W . CGP 42112A abolishes facilitation of recognition caused by angiotensin II and angiotensin II(3-7) in rats. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)*, 57(3): 227-234, 1997.
- Braszko JJ, Wisniewski K , Kupryszewski G , Witczuk B. Psychotropic effects of angiotensin II and III in rats: locomotor and exploratory vs. cognitive behaviour. *Behav Brain Res*, 25: 195-203, 1987.
- Braszko, JJ, Kupryszewski G, Witczuk B, Wisniewski, K. Angiotensin II (3-8)-hexapeptide affects motor activity, performance of passive avoidance and a conditioned avoidance response in rats. *Neuroscience*, 27: 777-783, 1988a.
- Braszko, JJ, Wlasienko, J, Koziolkiewicz, W, Janecka, A, Wisniewski, K. The 3-7 fragment of angiotensin II is probably responsible for its psychoactive properties. *Brain Res*, 542: 49-54; 1991.
- Brazzko JJ, Wisniewski, K. Effective angiotensin II and saralasin on motor activity in the passive avoidance behaviour in rats. *Peptides*, 9: 475-479, 1988b.
- Bressac C. Les organes neurohormonaux et les glandes endocrines de *Pachygrapsus marmoratus*. *Crustaceana*, 55 (1): 71-87, 1988.
- Bromberg, E, Santos, E.A, Bianchini, A. Osmotic and ionic regulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) during hiposmotic stress. *Nauplius*, 3 : 83, 1995.
- Brownlee DJ, Fairweather I . Exploring the neurotransmitter labyrinth in nematodes. *Trends Neurosci*, 22 (1): 16-24, 1999.
- Brunner D , Maldonado H. Habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *J. Comp. Physiol.* 152: 687-694, 1988.
- Bullock TH, Horridge G.A. Structure and functions in the nervous systems of invertebrates. Vol II, pp. 1063-1066. Ed. Whitaker, Emerson & Kennedy. W.H Freeman and Company, London. 1965.
- Bumpus, FM, Catt, KJ, Chiu, AT, DeGasparo, M, Goodfriend, T, Husain, A, Peach, MJ, Taylor, DG, Jr, Timmermans, PB. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the nomenclature committee of the council for high blood pressure research. *Hypertension*, 17: 720-721, 1991.
- Bunnemann B, Fuxe K, Ganten D. The brain renin-angiotensin system: localization and general significance. *J Cardiovasc Pharmacol*, 19 Suppl 6: S51-62, 1992.
- Bunnemann, B, Fuxe, K, Bjelke, B, Ganten, D. The brain renin-angiotensin system and its possible

involvement in volume transmission. In: *Transmission in the Brain: Novel Mechanism for Neural Transmission*, pp. 131-158. Ed. Fuxe K. And Agnati LF Raven press, NY, 1991.

- Cahill L, McGaugh JL. Emotional memory and declarative memory. *TINS*, 7: 294-298, 1998.
- Cahill L, McGaugh JL. Modulation of memory storage. *Curr Opin Neurobiol*, 6 (2): 237-242, 1996.
- Campbell, DJ, Habener, JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest*, 78: 31-39, 1986.
- Clark, JTA. A possible role for angiotensin II in the regulation of male sexual behaviour in rats. *Physiol Behav*, 45: 221-246, 1989.
- Cooke JM, Sullivan RE. Chapt. 6 Hormones and Neurosecretion. In: *The Biology of the Crustacea*, Vol 3 Ed. D. Bliss. Academic Press. New York, 1983.
- Cornell, M J, Williams, T A, Lamango, N S, Coates, D, Corvol, P, Soubrier, F, Hoheisel, J, Lehrach, H, Isaac, R E. Cloning and expression of an evolutionary conserved single-domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (23): 13613-13619, 1995.
- Costall B, Coughlan J, Hporovitz ZP, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. The effects of ACE inhibitor captopril and SQ29,852 in rodents test of cognition. *Pharmacol Biochem Behav*, 33 :576-579, 1989.
- Costall B, Domeney AM, Gerrard P, Hporovitz ZP, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Effects of captopril and SQ29,852 on anxiety-related behaviours in rodent and marmoset. *Pharmacol Biochem Behav*, 36: 13-20, 1990.
- Cottrell GA. The first peptide-gated ion channel. *J Exp Biol*, 200 (Pt 18): 2377-2386, 1997.
- Charmantier-Daures M, Charmantier G, Janssen KP, Aiken DE, van Herp F. Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster *Homarus americanus*. *Gen Comp Endocrinol*, 94 (3): 281-93, 1994.
- Chretien L, Guillemette G, Regoli D. Non peptide angiotensin receptor antagonist bind to tachykinin NK3 receptors of rats and guinea pig brain. *Eur J Pharm*, 256: 73-78, 1994.
- D'Incao F, Ruffino ML, da Silva KG, da Costa Braga A. Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda: Grapsidae) to salt-marsh environmental variations. *J Exp Biol Ecol*, 16: 179-178, 1992.
- Danser AH, van Kats JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Lamers JM, Verdouw PD, Saxena PR, Schalekamp M.A. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension*, 24: 37-48, 1994.
- De Loff A. Molecular structures of some vertebrate-type messenger peptides in invertebrates. In: *Progress in Comparative endocrinology*, Wiley-Liss, NY, pp. 16-21, 1990.
- De Silva PE, Husain A, Smeby RR, Ganong WF. Measurement of immunoreactivity angiotensin peptides in rat tissues: some pitfalls in angiotensin II. *Analysis Anal Biochem*, 174: 80-87, 1988.
- De Wied D, Gaffori O, Burbach JP, Kovacs GL, van Ree JM. Structure activity relationship studies with C-terminal fragments of vasopressin and oxytocin on avoidance behaviors of rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 241 (1): 268-274, 1987.
- De Wied D. Neuroendocrine aspects of learning and memory processes. *NIPS*, 4: 32-37, 1989.



- De Wied D. Neuropeptides in learning and memory processes. *Behav Brain Res*, 83 (1-2): 83-90, 1997.
- DeNoble VJ, DeNoble KF, Spencer KR, Chiu AT, Wong PC, Timmermans BM. Non-peptide angiotensin II receptor antagonist and angiotensin-converting enzyme inhibitor: effect on a renin-induced deficit of a passive avoidance response in rats. *Brain Res*, 561: 230-235, 1991.
- Denton DA, McKinley MJ, Weisinger RS. Hypothalamic integration of body fluid regulation. *Proc Nat Acad Sci USA*, 93: 7397-7404, 1996.
- Duve H, Johnsen AH, Maestro JL, Scott AG, Jaros PP, Thorpe A. Isolation and identification of multiple neuropeptides of the allatostatin superfamily in the shore crab *Carcinus maenas*. *Eur J Biochem*, 250 (3): 727-734, 1997.
- Dzau VJ, Sasamura H, Hein L. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J Hypertens*, 11: S13-18, 1993.
- Eckhardt E, Pierrot C, Thuet P, Van Herp F, Charmantier-Daures M, Trilles JP, Charmantier G. Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. *Gen Comp Endocrinol*, 99 (2): 169-177, 1995.
- Edwards DH, Heitler WJ, Krasne FB. Fifty years of a command neuron: the neurobiology of escape behavior in the crayfish. *Trends Neurosci*, 22 (4): 153-161, 1999.
- Eguchi S, Iwasaki H, Hirata Y, Frank GD, Motley ED, Yamakawa T, Numaguchi K, Inagami T. Epidermal growth factor receptor is indispensable for c-Fos expression and protein synthesis by angiotensin II. *Eur J Pharmacol*, 376(1-2): 203-206, 1999.
- Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsunomiya H, Inagami T. Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 271 (24):14169-14175, 1996.
- Elgersma Y, Silva AJ. Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*, 9 (2): 209-213, 1999.
- Fabris B, Yamada H, Cubela R, Jackson B, Mendelsohn FA, Johnston CI. Characterization of cardiac angiotensin converting enzyme (ACE) and in vivo inhibition following oral quinapril to rats. *Br J Pharmacol*, 100: 651-655, 1990.
- Faiman CP, De Erausquin GA, Baratti CM. Mecamylamine prevents the enhancement of retention induced by lysine vasopressin in mice. *Behav Neural Biol*, 48 (3): 434-439, 1987.
- Ferguson AV, Li Z. Whole cell patch recordings from forebrain slices demonstrate angiotensin II inhibits potassium currents in subfornical organ neurons. *Regul Pept*, 66 (1-2): 55-58, 1996.
- Ferguson AV, Washburn DL. Angiotensin II: a peptidergic neurotransmitter in central autonomic pathways. *Prog Neurobiol*, 54 (2): 169-192, 1998.
- Fernlund P, Josefsson L. Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science*, 177: 173-174, 1972.
- Fewou J, Dhainaut-Courtois N. Research on polychaete annelid osmoregulatory peptide(s) by immunocytochemical and physiological approaches. Computer reconstruction of the brain and evidence for a role of angiotensin-like molecules in *Nereis* (Hediste) *diversicolor* OF Mueller.

Biology of the Cell (Paris), 85 (1): 21-33, 1995.

- Fingerman M, Nagabhushanam R. Control of the release of crustacean hormones by neuroregulators. *Comp. Biochem. Physiol*, 102C (3) :343-352, 1992.
- Fingerman M. Crustacean Endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis. *Physiological Zoology*, 70 (3): 257-269, 1997.
- Fingerman M, Nagabhushanam R, Sarajonbi R. Vertebrate-type hormones in crustaceans; localization, identification and functional significance. *Zoological Science*, 10: 13-29, 1993.
- Fingerman M. The endocrine mechanism of crustaceans. *J. Crustacean Biol*, 7 (1): 1-24, 1987.
- Finkielman S, Nahmod VE. In vitro production of angiotensin I by renal glomeruli. *Nature*, 222: 1186, 1969.
- Fischer-Ferraro C, Nahmod VE, Goldstein DJ, Finkielman S. Angiotensin and renin in rat and dog brain. *The Journal of Experimental Medicine*, 133 (2): 353-361, 1971.
- Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev*, 78 (3): 583-686, 1998.
- Flood JF, Morley JE. Cholecystokinin receptors mediate enhanced memory retention produced by feeding and gastrointestinal peptides. *Peptides*, 10 (4): 809-813, 1989.
- Flood JF, Morley JE. Dose-response differences in the ability of ramipiril to improve retention in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol*. 240: 311-314, 1993.
- Franci CR, Anselmo-Franci JA, McCann SM. Angiotensinergic neurons physiologically inhibit prolactin, growth hormone, and thyroid-stimulating hormone, but not adrenocorticotrophic hormone, release in ovariectomized rats. *Peptides*, 18 (7): 971-976, 1997.
- Freudenthal R, Locatelli F, Hermitte G, Maldonado H, Delorenzi A, Romano A. N(-B like DNA binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci Lett*, 242 :143-146, 1997.
- Frey U, Morris RG. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*, 385: 533-536, 1997.
- Friedlan Y, Silverstein FA. A sensitive fluorometric assay for serum angiotensin converting enzyme. *Am J Pathol*, 66: 416-424, 1976.
- Fuentes J, Eddy FB. Effect of manipulation of the renin-angiotensin system in control of drinking in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L) in fresh water and after transfer to sea water. *J Comp Physiol B*, 167 (6): 438-443, 1997.
- Fuxe K, Agnati LF. Two principal modes of electrochemical communication in the brain: volume versus wiring transmission, pp 1-9. In: *Advances in neuroscience. Vol1: Volume transmission in the brain*. eds Fuxe and Agnati., Raven Press, NY, 1991.
- Fuxe K, Ganten D, Hokfelt T, Locatelli V, Poulsen K, Stock G, Rix E, Taugner R. Renin-like immunocytochemical activity in the rat and mouse brain. *Neurosci Lett*, 18 (3): 245-250, 1980.
- Galli SM and Phillips MI. Interactions of angiotensin II and atrial natriuretic peptide in the brain: fish to rodent. *Proc Soc Exp Biol Med*, 213: 128-137, 1996.
- Ganong, W.F. Origin of the angiotensin II secreted by cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 205: 213-219, 1994.
- Ganten D, Fuxe K, Ganten U, Hokfelt T, Bolme P. The brain isorenin-angiotensin system: localization and biological function. *Prog Brain Res*, 47: 155-159, 1977.

- Garcia U, Arechiga H. Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. *Cell Mol Neurobiol*, 18 (1): 81-89, 1998.
- Geraerts W, Smit AB, Li KW, Hordijk PL. The light green cells of *Lymnaea*: a neuroendocrine model system for stimulus-induced expression of multiple peptide genes in a single cell type. *Experientia*, 48: 464-473, 1992.
- Glantz RM, McIsaac A. Two-channel polarization analyzer in the sustaining fiber-dimming fiber ensemble of crayfish visual system. *J Neurophysiol*, 80 (5): 2571-2583, 1998.
- Glantz RM, Viancour T. Integrative properties of crayfish medial giant neuron: Stereostatic model. *J Neurophysiol*, 50 (5): 1122-1142, 1983.
- Glantz RM, Wyatt C, Mahncke H. Directionally selective motion detection in the sustaining fibers of the crayfish optic nerve: linear and nonlinear mechanisms. *J Neurophysiol*, 74 (1): 142-152, 1995.
- Glantz RM. Directionality and inhibition in crayfish tangential cells. *J Neurophysiol*, 79 (3): 1157-1166, 1998.
- Glantz RM. Polarization sensitivity in the crayfish optic lobe: peripheral contributions to opponency and directionally selective motion detection. *J Neurophysiol*, 76 (5): 3404-3414, 1996.
- Godoy AM, Maldonado H. Modulation of the escape response by [D-Ala<sup>2</sup>]Met-enkephalin in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav*, 50 (3): 445-451, 1995.
- Goebel P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER. The long and the short of long-term memory: a molecular framework. *Nature*, 322 (6078): 419-422, 1986.
- Gohlke P, Pees C, Unger T. AT<sub>2</sub> receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension*, 31(1Pt 2): 349-355, 1998.
- Gold PE, McGaugh JL. Hormones and memory. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 17: 127-143, 1977.
- Gold PE, van Buskirk R. Effects of posttrial hormone injections on memory processes. *Horm Behav*, 7 (4): 509-517, 1976.
- Gonzalez GC, Roger I, Gonzalez E, Martinez-Padron M, Moore G J, Lukowiak K. Angiotensinogen-like epitopes are present in the CNS of *Aplysia californica* and co-localize with urotensin I- and urotensin II-like immunoreactivities in the cerebral ganglia. *Neuroreport*, 6 (3): 541-544, 1995.
- Graeff FG, Gentol CG, Peres VL and Covian MR. Lever pressing behaviour caused by intraseptal angiotensin II in water satiated rats. *Pharm Biochem Behav*, 1: 357-359, 1973.
- Gray DA, Erasmus T. J. Control of renal and extrarenal salt and water excretion by plasma angiotensin II in the kelp gull (*Larus dominicanus*). *Comp Physiol B*, 158 (6): 651-660, 1989.
- Greenwood FC, Hunter WH, Glover JS. The preparation of <sup>131</sup>I-labelled growth hormone of high specific activity. *Biochem J*, 89: 114-119, 1963.
- Grimmelikhuijzen C, Leviev IK and Carstensen K. Peptides in the nervous system of cnidarians: Structure, function and biosynthesis. *International Rev of Cytology*, 167: 37-89, 1992.
- Gupta A. Evolutionary trends in the central and mushroom bodies of the arthropod brain. A dilemma. In: *Arthropod Brain. Its evolution, development, structure and functions*. A. Gupta (ed). Wiley & Sons, New York. 1987.
- Hammer M, Menzel R. Learning and memory in the honeybee. *J Neurosci*, 15(3 Pt 1): 1617-1630, 1995.

- Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res*, 84 (6): 695-703, 1999.
- Harris RC, Cheng HF. The intrarenal renin-angiotensin system: a paracrine system for the local control of renal function separate from the systemic axis. *Exp Nephrol*, 4 Suppl 1: 2-7, 1996.
- Hata A, Namikawa C, Sasaki M, Sato K, Nakamura T, Tamura K, Lalouel JM. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J Clin Invest*, 93: 1285-1287, 1994.
- Healy DP, Wilk S. Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. II. Distribution and correlation with angiotensin II. *Brain Res*, 606 (2): 295-303, 1993.
- Hermitte G, Pedreira ME, Tomsic D, Maldonado H. Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed, training in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem*, 71(1): 34-49, 1999.
- Hilgers KF, Pentz ES, Gomez RA. Angiotensin-dependent gene expression in the developing rat kidney. *Kidney Int Suppl*, 67 (1): 46-48, 1998.
- Hillyard SD, Hoff KS, Propper C. The water absorption response: a behavioral assay for physiological processes in terrestrial amphibians. *Physiol Zool*, 71 (2): 127-138, 1998.
- Hirano T, Mayer-Gostan N. Endocrine control of osmoregulation in fish. In: Galliard Pj, Boer HH, Eds. *Comparative endocrinology*. Amsterdam: Elsevier, pp 209-212., 1978.
- Hoeger, U. and Florey, E., Catecholamine degradation in the hemolymph of the chinese crab, *Eriocheir sinensis*, *Comp. Biochem. Physiol. C*, 92 (1989) 323-327.
- Hokfelt T, Zhang X, Wiesenfeld-Halin Z. Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci*, 17: 22-30, 1994.
- Hokfelt T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron*. 7(6): 867-879, 1991.
- Holy Z, Braszko JJ, Kupryszewski G, Witczuck B, Wisniewski K. Angiotensin II-derived peptides devoid of phenylalanine in the position 8 have full psychotropic activity of the parent hormone. *J Physiol Pharmacol*, 43 (2): 183-192, 1992.
- Hughes J, Smith T, Morgan B, Fothergill L. Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life Sci*, 16 (12): 1753-1758, 1975.
- Hume RI, Berlind A. Heart and scaphognathite rate changes in a euryhaline crab *Cracinus* means exposed to dilute environmental medium. *Biological Bull*, 150: 241-254, 1976.
- Hunyady L, Baukal AJ, Balla T, Catt KJ. Independence of type I angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction. *J Biol Chem* 269: 24798-24804, 1994.
- Huston JP, Hasenohrl RU. The role of neuropeptides in learning: focus on the neurokinin substance P. *Behav Brain Res*, 66 (1-2): 117-127, 1995.
- Isaac RE, Schoofs L, Williams TA, Corvol P, Veelaert D, Sajid M, Coates D. Toward a role for angiotensin-converting enzyme in insects. Vaudry, H., et al. (Ed.). *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 839. Trends in comparative endocrinology and neurobiology: From molecular to integrative biology; New York, 839: 288-292, 1998.
- Iversen SD. The pharmacology of memory. *C R Acad Sci III*, 321 (2-3): 209-215, 1998.
- Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for

memory types differ. *Nature*, 393: 635-636, 1998.

- Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*, 68 (3): 285-316, 1997.
- Izquierdo I. Different forms of post-training memory processing. *Behav Neural Biol*, 51 (2): 171-202, 1989.
- Jaros P.P. Tracing neurosecretory neurons in crayfish optic ganglia by cobalt iontophoresis. *Cell. Tissue Res*, 194: 297-302, 1978.
- Jhamandas JH, Lind RW, Renaud LP. Angiotensin II may mediate excitatory neurotransmission from the subfornical organ to the hypothalamic supraoptic nucleus: an anatomical and electrophysiological study in the rat. *Brain Res*, 487 (1): 52-61, 1989.
- Johnston CI. Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs*, 39 (1): 21-31, 1990.
- Jurkies B, Eckstein A, Jacobi P, Kohler K, Risler T, Zrenner E. The renin-angiotensin system—a possible neuromodulator in the human retina? *Ger J Ophthalmol*, 4 (3): 144-150, 1995.
- Kai H, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Lyons PR, Akers M, Griendling KK. G-Protein binding domains of the angiotensin II AT1A receptors mapped with synthetic peptides selected from the receptor sequence. *Biochem J*, 332 ( Pt 3): 781-787, 1998.
- Kamemoto FI. Neuroendocrinology of osmoregulation in decapod Crustacea. *American Zoologist*, 16: 141-150, 1975.
- Kamemoto FI. Neuroendocrinology of osmoregulation in crabs. *Zoological Science*, 8: 827-833, 1991.
- Kanashiro CA, Paiva TB, Paiva AC, Prioste RN, Aboulafia J, Shimuta SI. Angiotensin II tachyphylaxis in the guinea pig ileum and its prevention: a pharmacological and biochemical study. *J Pharmacol Exp Ther*, 275 (3): 1543-1550, 1995.
- Kandel ER, Schwartz JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*, 218: 433-443, 1982.
- Kandel ER. Genes, synapses, and long-term memory. *J Cell Physiol*, 173 (2): 124-125, 1997.
- Kato H, Iwai N, Inui H, Kimoto K, Uchiyama Y, Inagami, T. Regulation of vascular angiotensin release. *Hypertension*, 21: 446-454, 1993.
- Keller R. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia*, 48 (5): 439-448, 1992.
- Keller-Wood MK, Strenstrom B, Shinisako J, Phillips MI. Interaction between CRF and ANG II in the control of ACTH and adrenal steroids. *Am J Physiol*, 250: R306-402, 1986.
- Kety SS. The possible role of the adrenergic systems of the cortex in learning. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 50: 376-389, 1972.
- Kinoshita A, Urata H, Bumpus FM, Husain A. Multiple determinants for the high substrate specificity of an angiotensin II-forming chymase from the human heart. *J Biol Chem*, 266 (29): 19192-19197, 1991.
- Koller M, Krause HP, Hoffmeister F and Ganten D. Endogenous brain angiotensin II disrupts passive avoidance behavior in rats. *Neurosci Lett*, 14: 71-75, 1979.
- Korn H, Faber DS. Escape behavior-brainstem and the spinal cord circuitry and function. *Curr. Op.*

in Neurobiol, 6: 826-832, 1996.

- Kostowski W, Tarchalska-Krynska B, Markowska L. Aggressive behavior and brain serotonin and catecholamines in ants (*Formica rufa*). Pharmacol Biochem Behav, 3: 4 717-4719, 1975.
- Kovacs, GL, De Wied D. Peptidergic modulation of learning and memory processes. Pharmacol Rev, 46 (3): 269-291; 1994.
- Kovacs GL, Telegdy G. Role of oxytocin in memory and amnesia. Pharmacol Rev, 46 (3): 269-291, 1994.
- Krasne FB. Extrinsic control of intrinsic neuronal plasticity: an hypothesis from work on simple systems. Brain Res, 140 (2): 197-216, 1978.
- Kravitz EA. Hormonal control of behavior: amines and the biasing of behavioral output in lobsters. Science, 241 (4874): 1775-1781, 1988.
- Kucharski LC, Ribeiro MF, Schein V, da Silva RS, Marques M. Insulin binding sites in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. J Exp Zool, 279 (2): 118-125, 1997.
- Kulakowska A, Karwowska W, Wisniewski K, Braszko JJ. Losartan influences behavioural effects of angiotensin II in rats. Pharmacol Res, 34 (3): 4109-4115, 1996.
- Kupfermann I. Functional studies of cotransmission. Physiol Rev, 71 (3): 683-732, 1991.
- Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N. Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT<sub>2</sub> receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT<sub>1</sub> receptors. J Biol Chem, 271 (37): 22729-22735, 1996.
- Lamango NS, Nachman RJ, Hayes TK, Strey A, Isaac RE. Hydrolysis of insect neuropeptides by an angiotensin-converting enzyme from the housefly, *Musca domestica*. Peptides (Tarrytown), 18 (1): 47-52, 1997.
- Lamango NS, Sajid M, Isaac R E. The endopeptidase activity and the activation by Cl<sup>-</sup> of angiotensin-converting enzyme is evolutionary conserved: Purification and properties of an angiotensin-converting enzyme from the housefly, *Musca domestica*. Biochemical Journal, 314 (2): 639-646, 1996.
- Landgraf R, Wotjak CT, Neumann ID, Engelmann M. Release of vasopressin within the brain contributes to neuroendocrine and behavioral regulation. Prog Brain Res, 119: 201-220, 1998.
- Landgraf R, Wotjak CT, Neumann ID, Engelmann M. Release of vasopressin within the brain contributes to neuroendocrine and behavioral regulation. Prog Brain Res, 119: 201-220, 1998.
- Laurent V, Bulet P, Salzter MA. Comparison of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin I-like molecule with forms of vertebrate angiotensinogens: a hormonal system conserved in the course of evolution, Neurosc Lett, 190: 175-178, 1995a
- Laurent V, Salzter M. Biochemical properties of the angiotensin-converting-like enzyme from the leech *Theromyzon tessulatum*. Peptides (Tarrytown), 17 (5): 737-745, 1996a.
- Laurent V, Salzter M. Isolation of a renin-like enzyme from the leech *Theromyzon tessulatum*. Peptides (Tarrytown), 16 (8): 1351-1358, 1995c.
- Laurent V, Salzter M. Metabolism of angiotensins by head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum*. FEBS Letters, 384 (2): 123-127, 1996b.
- Laurent V, Salzter MA. Comparison of the N-terminal sequence of the leech *Theromyzon tessulatum*

angiotensin converting-like enzyme with forms of vertebrate angiotensin converting enzymes.

Neuroscience Letters, 198 (1): 60-64, 1995b.

- Laurent V, Stefano GB, Salzet M. The leech angiotensin-converting enzyme. Vaudry, H., et al. (Ed.). Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 839. Trends in comparative endocrinology and neurobiology: From molecular to integrative biology, New York. 839: 500-502, 1998.
- Lenkei Z, Nuyt AM, Grouselle D, Llorens-Cortés C. Identification of endocrine cell populations expressing the AT1B subtype of angiotensin II receptors in the anterior pituitary. Am J Physiol, 275 (1 Pt2): R234-244, 1999.
- Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortés C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. Front Neuroendocrinol, 18 (4): 383-439, 1997.
- Lind RW, Johnson. Subfornical organ-median preoptic connections and drinking and pressor response to angiotensin II. J Neurosci 2: 1043-1051, 1982.
- Linz W, Scholkens BA. Role of bradykinin in the cardiac effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. J Cardiovasc Pharmacol, 20 (Suppl. 9): S83-90, 1992.
- Lipke DW, Olson KR. Distribution of angiotensin-converting enzyme-like activity in vertebrates tissues. Physiol Zool, 61: 420-428, 1988.
- Liu FY, Cogan MG. Angiotensin II: a potent regulator of acidification in the rat early proximal convoluted tubule. J Clin Invest, 80: 272-275, 1987.
- Loeb MJ, De Loof A, Schoofs L, Isaac E. Angiotensin II and angiotensin-converting enzyme as candidate compounds modulating the effects of testis ecdysiotropin in testes of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. Gen Comp Endocrinol, 112 (2): 232-239, 1998.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265-275, 1951.
- Lozada M, Romano A, Maldonado H. Effect of morphine and naloxone on a defensive response of the crab *Chasmagnathus granulatus*. Pharmacol Biochem Behav, 30 (3): 635-640, 1988.
- Lozada M, Romano A, Maldonado H. Long-term habituation to a danger-stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. Physiol and Behav, 47: 35-41, 1990.
- Luquet C.M, Ford P, Rodriguez E, Ansaldo M, Stella V. Ionic regulation patterns in two species of estuarine crabs. Comunicaciones Biológicas, 10: 315-325, 1992.
- Luquet CM, Pellerano G, Rosa G. Salinity-induced changes in the fine structure of the gills of the semiterrestrial estuarine crab, *Uca uruguayensis* (Nobili, 1901) (Decapoda, Ocypodidae). Tissue & Cell, 29 (4): 495-501, 1997.
- Lynch KR, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG. Localization of brain angiotensinogen mRNA by hybridization histochemistry. Mol. Brain Res, 2: 149-158, 1987.
- Makra ME, Prior DJ. Angiotensin II Can Initiate Contact-Rehydration in Terrestrial Slugs *Limax-Maximus*. Journal of Experimental Biology, 119: 385-388, 1985.
- Maldonado H, Romano A, Tomsic D. Long-term habituation (LTH) in the crab *Chasmagnathus*: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. Braz J Med Biol Res, 30 (7): 813-826, 1997.

- Mancillas JR, McGinty JF, Selverston. Immunocytochemical localization of enkephalin and substance P in retina and eyestalk neurones of lobster. *Nature*, 293: 576-578, 1981.
- Mantel LH, Farmer LL. Osmotic and ionic regulation. In: *The Biology of Crustacea Vol. 5*. p.53-161. Ed. Bliss. Academic Press. New York, 1983.
- Mantel LH. Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. *American Zoologist*, 25: 253-263, 1985.
- Marabet L, de Dasparo M, Casanova C. Dose-dependent inhibitory effects of angiotensin II on visual response of the rat superior colliculus: AT1 and AT2 receptor contributions. *Neuropeptides*, 31 (5): 469-481, 1997.
- Mark G. Darlison, Dietmar Richter . Multiple genes for neuropeptides and their receptors: co-evolution and physiology. *Trends in Neurosciences*, 22 (2): 81-88, 1999.
- Marrero MB, Venema VJ, Ju H, Eaton DC, Venema RC. Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. *Am J Physiol*, 275 (5 Pt 1): C1216-1223, 1998.
- Martin G, Dubois MP. A somatostatin-like antigen in the nervous system of an isopod *Porcellio dilatatus* Brandt. *Gen Comp Endocrinol*, 45 (1): 125-130, 1981.
- Martinez EA, Murray M, Leung MK, Stefano GB. Evidence for dopaminergic and opioid involvement in the regulation of locomotor activity in the land crab *Gecarcinus lateralis*. *Comp Biochem Physiol C*, 90 (1): 89-93, 1988.
- Mathai ML, Evered MD, McKinley MJ. Central losartan blocks natriuretic, vasopressin, and pressor responses to central hypertonic NaCl in sheep. *Am J Physiol*, 275 (2 Pt 2): R548-554, 1998.
- Mayer EA, Baldi JP. Can regulatory peptides be regarded as words of a biological language. *Am J Physiol*, 261 (2 Pt 1): G171-184, 1991.
- McGaw IJ, Reiber CL. Circulatory modification in the blue crab *Callinectes sapidus*, during exposure and acclimation to low salinity. *Comparative Biochemistry & Physiology*. 121 (1): 67-76, 1998.
- McNamara JC, Salomao LC, Ribeiro ES. The effect of eyestalk ablation on haemolymph osmotic and ionic concentrations during acute salinity exposure in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Hydrobiologia*, 199: 193-200, 1990.
- McGaugh JL. Drug facilitation of learning and memory. *Annu Rev Pharmacol*, 13: 229-241, 1973.
- McGaugh JL. Hormonal influences on memory. *Annu Rev Psychol*, 34: 297-323, 1983.
- McKinley M.J. and Oldfield B.J. The brain as an endocrine target for peptide hormones. *TEM*, 9 (9): 349-354, 1998.
- McNamara J. Exposure to high salinity medium and neurosecretion in the anteromedial cells of the supraesophageal ganglion of the fresh-water shrimp. *J Crust Biol*, 13 (3): 409-422, 1993.
- Medina M, Reperant J, Miceli D, Bertrand C, Bennis M. An immunohistochemical study of putative neuromodulators and transmitters in the centrifugal visual system of the quail (*Coturnix japonica*). *J Chem Neuroanat*, 15 (2): 75-95, 1998.
- Meller VH, Davis RL. Biochemistry of insect learning: lessons from bees and flies. *Insect Biochem Mol Biol*, 26 (4): 327-335, 1996.
- Menzel R, Hammer M, Müller U, Rosenboom H. Behavioral, neural and cellular components



- underlying olfactory learning in the honeybee. *J Physiol Paris*, 90 (5-6): 395-398, 1996.
- Mercier AJ, Orchard I, TeBrugge V, Skerrett M. Isolation of two FMRFamide-related peptides from crayfish pericardial organs. *Peptides*, 4 (2): 137-143, 1993.
  - Miczek KA, Weerts E, Haney M, Tidey J. Neurobiological mechanisms controlling aggression: preclinical developments for pharmacotherapeutic interventions. *Neurosci Biobehav Rev*, 18 (1): 97-110, 1994.
  - Michels KM, Heemskerk FM, Saavedra JM. Selective changes in angiotensin II AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat superior colliculus following eye enucleation. *Neuroscience*, 58 (4): 835-844, 1994.
  - Miserey S, Clauser E. Angiotensin II receptors: classification, structure, and signal transduction. *Therapie*, 53 (3): 205-211, 1998.
  - Mishkin M. A memory system in the monkey. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 298: 83-95, 1982.
  - Moeller I, Albiston AL, Lew RA, Mendelsohn FA, Chai SY. A globin fragment, LVV-hemorphin-7, induces [3H]thymidine incorporation in a neuronal cell line via the AT4 receptor. *J Neurochem*, 73 (1): 301-308, 1999.
  - Moeller I, Lew RA, Mendelsohn FA, Smith AI, Brennan ME, Tetaz TJ, Chai SY. The globin fragment LVV-hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT4 receptor in the brain. *J Neurochem*, 68 (6): 2530-2537, 1997.
  - Mondadori C, Etienne P. Nootropic effects of ACE inhibitors in mice. *Psychopharmacology*, 100: 301-307, 1990.
  - Mondadori C, Gentsch C, Hengerer B, Ducret T, Borkowski J, Racine A, Lederer R, Haeusler A. Pretreatment with aldosterone or corticosterone blocks the memory-enhancing effects of nimodipine, captopril, CGP 37,849, and strychnine in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 109 (4): 383-389, 1992.
  - Mondadori C, Hengerer B, Ducret T, Borkowski J. Delayed emergence of effects of memory-enhancing drugs: implications for the dynamics of long-term memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (6): 2041-2045, 1994.
  - Morgan L, Pipkin FB, Kalsheker N. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol*, 28 (11): 1211-1222, 1996.
  - Morgan TM, Routtenberg A. Angiotensin injected into the neostriatum after learning disrupts retention performance. *Science*, 196: 878-889, 1977.
  - Morley JE. The role of peptides in appetite regulation across species. *Amer Zool*, 35: 437-445, 1995.
  - Nagabhushanam R, Sarajonbi R, Reddy PS, Devi M, Fingerman M. Piod peptides in invertebrates: Localization, distribution and possible functional roles. *Current Science*, 69 (8): 656-669, 1995.
  - Nahmod VE, Finkielman S, de Gorodner O, Goldstein DJ. On the neural localization and the physiological variations of brain angiotensin. In *central actions of angiotensin and related hormones: Proc Biochem Pharmacol*, 573-579, 1976.
  - Nahmod VE, Fischer-Ferraro C, Finkielman S, Diaz A, Goldstein DJ. Renin and angiotensin in extra-renal tissues. *Medicina (B Aires)*, 1: 43-47, 1972.

- Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ . The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (23): 10663-10667, 1995.
- Nässel DR . Peptidergic neurohormonal control systems in invertebrates. *Curr Opin Neurobiol*, 6 (6): 842-850, 1996.
- Nässel DR, Elosfsson R. Comparative anatomy of the crustacean brain. In: *Arthropod Brain. Its evolution, development, structure and functions*. A. Gupta (ed). Willey & Sons, New York. 1987.
- Nässel DR. Neuropeptides, multifunctional messengers in the nervous system of insects. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, 87 (2): 59-81, 1994.
- Nässel DR. Neuropeptides in the insect brain: a review. *Cell Tissue Res*, 273: 1-29, 1993.
- Nässel DR. Types and arrangements of neurons in the crayfish optic lamina. *Cell. Tissue Res*, 179: 45-47, 1977.
- Nery LEM, Santos EA. Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *Comp Biochem Physiol*, 106B: 747-753, 1993.
- Nicholls JG, Robert Martin A, Walalce, BG. *From neuron to the brain*. Sinauer Assoc, pp 330, Massachusetts, USA, 1994.
- Okuda M, Kawahara Y, Yokoyama M. Angiotensin II type I receptor-mediated activation of Ras in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 271 (2 Pt 2): H595-601, 1996.
- Olfeld BJ, Hards DK, McKinley MJ. Fos production in retrigradely-labelled neurons of the lamina terminals following intravenous infusion of either hypertonic saline or angiotensin II. *Neuroscience*, 60: 255-262, 1995.
- Page I, Bumpus F. (eds.). *Angiotensin*. [Handbuch der Experimentellen Pharmakologie,] Vol. 37. Springer-Verlag, Berlin, 1974.
- Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*, 57: 313-370, 1977.
- Pedreira ME, Dimant B, Tomsic D, Quesada-Allue LA, Maldonado H. Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav*, 52 (2): 385-395, 1995.
- Pedreira ME, Romano A, Tomsic D, Lozada M, Maldonado H. Massed and spaced training build up different components of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal Learning & Behavior*. 26 (1): 34-45, 1998.
- Peeke HVS, Veno A. Response independent habituation of territorial aggression in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Zeitschrift für Tierpsychologie*. 40: 53-58, 1976.
- Pelz C, Gerber B, Menzel R. Odorant intensity as a determinant for olfactory conditioning in honeybees: roles in discrimination, overshadowing and memory consolidation. *J Exp Biol*, 200 (Pt 4): 837-847, 1997.
- Pellicer, EP, Palumbo A, DeChevney AH, Nafloin F. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science*, 240: 1660-1661, 1988.
- Péqueux A. Osmotic regulation in crustaceans. *J Crustacean Biology*, 15 (1): 1-60, 1995.

- Pereyra P, de la Iglesia H, Maldonado H. Training to testing intervals different from 24 hours impair habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Physiol & Behav* 59: 19-25, 1996.
- Pereyra P, Saraco M, Maldonado H. Decreased response or alternative defensive strategies in escape: two different types of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *J Comp Physiol*. In press, 1999.
- Pfeiffer C, Glantz RM. Cholinergic synapses and the organization of contrast detection in the crayfish optic lobe. *J Neurosci*, 9 (6): 1872-1882, 1989.
- Phillips M.I, Speakman EA, Kimura B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul. Pept*, 43: 1-20, 1993.
- Phillips M.I, Speakman EA, Kimura B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regulatory Peptides*, 43: 1-20, 1993.
- Phillips M.I. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, 49: 413-435, 1987.
- Pow DV, Morris JF. Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophyseal peptides by exocytosis. *Neuroscience*, 32: 435-439, 1989.
- Rajpara SM, Garcia PD, Roberts R, Eliassen JC, Owens DF, Maltby D, Myers RM, Mayeri E. Identification and molecular cloning of a neuropeptide Y homolog that produces prolonged inhibition in *Aplysia* neurons. *Neuron*, 9(3): 505-513, 1992.
- Rescorla DA, Holland PC. Some behavioral approaches to the study of learning. In M R Rosenzweig and E L Bennet Eds. *Neural mechanism of learning and memory*, pp 185-189. Cambridge. MIT press, 1976.
- Rescorla DA. Pavlovian conditioning: It's not what you think it is. *American Psychologist*, 43: 151-160, 1988.
- Richoux JP, Bouhnik J, Clauser E, Corvol P. The renin-angiotensin system in the rat brain. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in glial cells and neurons. *P Histochemistry*, 89 (4): 323-331, 1988.
- Rolls BJ, Jones BP, Fallows DJA. A comparison of the motivational properties of the thirst. *Physiol. Behav.* 9: 777-482, 1972.
- Romano A, Locatelli F, Delorenzi A, Pedreira ME, Maldonado H. Effects of activation and inhibition of cAMP-dependent protein kinase on long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res*, 30;735(1):131-40, 1996.
- Romano A, Locatelli F, Delorenzi A, Pedreira ME, Maldonado H. Effects of activation and inhibition of cAMP-dependent protein kinase on long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res*, 735 (1): 131-140, 1996.
- Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev*, 13 (2): 329-380, 1992.
- Salzet M, Bulet P, Watez C, Verger-Bocquet M, Malecha J. Structural Characterization of a Diuretic peptide from the Central Nervous System of the leech *Erythrina octoculata*: Angiotensin II amide. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (4): 1575-1582, 1995.
- Salzet M, Stefano G. A renin-like enzyme in the leech *Theromyzon tessulatum*. *Mol Cell Endocrinol*, 131 (1): 1-8, 1997.

- Salzet M, Verger-Bocquet M, Watzet C, Malecha J. Evidence for angiotensin-like molecules in the central nervous system of the leech *Theromyzon tessulatum* (OFM): A possible diuretic effect. *Comparative Biochemistry and Physiology A Comparative Physiology*, 101(1): 83-90, 1992.
- Salzet M, Watzet C, Baert JL, Malecha J. Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *Brain Research*, 631 (2): 247-255, 1993.
- Sandeman DC, Sademan R, Derby C, Schmidt M. Morphology of the Brain Crayfish, Crabs, and Spiny Lobsters: A Common Nomenclature for Homologous Structures. *Biol. Bull*, 183: 304-326, 1992.
- Sandeman DC, Scholtz G, Sandeman RE. Brain evolution in decapod crustacea. *J Exp Zool*, 265: 112-133, 1993.
- Sandeman DC. Organization of the central nervous system. In *The biology of the crustacea*. Vol. 4. p.1-31. Ed. Sandeman & Atwood. Academic Press, 1982.
- Sandeman DC. The vascular circulation in the brain, optic lobes and thoracic ganglia of the crab *Carcinus*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 168 (10): 82-90, 1967.
- Santos MCF, Moreira GS. Time course of osmotic compensations to acute salinity exposure in the ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787). *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*. 235 (1): 91-104, 1999.
- Sarojini R, Nagabhushanam R, Fingerman M. Dopaminergic and enkephalinergic involvement in the regulation of blood glucose in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Gen Comp Endocrinol*, 97 (1): 160-170, 1995.
- Satake H, Takuwa K, Minakata H, Matsushima O. Evidence for conservation of the vasopressin/oxytocin superfamily in Annelida. *J Biol Chem*, 274 (9): 5605-5611, 1999.
- Schaller HC, Hermans-Borgmeyer I, Hoffmeister SA. Neuronal control of development in hydra. *Int J Dev Biol*, 40 (1): 339-344, 1996.
- Schmidt M, Demuth S. Neurogenesis in the central olfactory pathway of adult decapod crustaceans. *Ann N Y Acad Sci*, 855: 277-280, 1998.
- Schmitt ASC, Santos EA. Behaviour and hemolymphatic ionic composition of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda) during emersion. *Comp. Biochem. Physiol.* 106 (2): 337-342, 1993.
- Schoofs L, Veelaert D, De Loof A, Huybrechts R, Isaac E. Immunocytochemical distribution of angiotensin I-converting enzyme-like immunoreactivity in the brain and testis of insects. *Brain Research*, 785 (2): 215-227, 1998.
- Sedman G, O'Dowd B, Rickard N, Gibbs ME, Ng KT. Brain metabolic activity associated with long-term memory consolidation. *Mol Neurobiol*, 5 (2-4): 351-354, 1991.
- Sernia C, Zeng T, Kerr D, Wyse B. Novel perspectives on pituitary and brain angiotensinogen. *Front. Neuroendocrinol.* 18 (2): 174-208, 1997.
- Shaw C. Neuropeptides and their evolution. *Parasitology*. 113 (SUPPL.): S35-45, 1996
- Shepherd J, Bill DJ, Dourish CT, Grewal SS, McLeanachan, Stanhope KJ. Effects of the selective angiotensin II receptor antagonists Losartan and PD123177 in animal models of anxiety and memory. *Psychopharmacol*, 126: 206-218, 1996.

- Simpson JB, Routhemberg A. The subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. *Science*, 181: 1172-1174, 1973.
- Skeggs L, Jr. Historical overview of the renin-angiotensin system. In, *Hypertension and the Angiotensin System: Therapeutic Approaches*. (Doyle, A.E., and Beam, A.G., Eds.) Raven Press, New York, pp. 31-45, 1984.
- Smiley JW, Doig MT. Distribution and characterization of angiotensin-converting enzyme-like activity in tissues of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 108 (4): 491-496, 1994.
- Smit AB, van Kesteren RE, Li KW, Van Minnen J, Spijker S, Van Heerikhuizen H. Towards understanding the role of insulin in the brain: lessons from insulin-related signaling systems in the invertebrate brain. *Prog Neurobiol*, 54 (1): 35-54, 1988.
- Solomon PR, Vander Schaaf ER, Thompson RF, Weisz DJ. Hippocampus and trace conditioning of the rabbit's classically conditioned nictitating membrane response. *Behav Neurosci*, 100 (5): 729-744, 1986.
- Sombati S, Hoyle G., Central nervous sensitization and dishabituation of reflex action in an insect by the neuromodulator dopamine. *J Neurobiol*, 15: 445-480, 1984.
- Sossin WS, Scheller RH. Biosynthesis and sorting of neuropeptides. *Curr Opin Neurobiol*, 1: 79-83, 1991.
- Sossin WS, Sweet-Cordero A, Scheller RH. Dale's hypothesis revisited: different neuropeptides derived from a common prohormone are targeted to different processes. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 87 (12): 4845-4848, 1990.
- Spatz HC. Hebb's concept of synaptic plasticity and neuronal cell assemblies. *Behav Brain Res*, 78 (1): 3-7, 1996.
- Squire L.R. *Memory and Brain*, pp 39-55. New York: Oxford University Press, 1987.
- Squire LR, Knowlton B, Musen G. The structure and organization of memory. *Ann Rev Psychol*, 44: 453-495, 1993.
- Smia C, Zeng T, Kerr D, Wyse B. Novel perspectives on pituitary and brain angiotensinogen. *Front Neuroendocrinol*, 18 (2): 174-208, 1997.
- Stornetta RL, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG, Lynch KR. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science*, 242: 1444-1446, 1988.
- Strausfeld NJ, Buschbeck EK, Gomez RS. The arthropod mushroom body: Its functional roles, evolutionary enigmas and mistaken identities. In *The nervous system of the invertebrates: An evolutionary and comparative approach*. eds. O. Breidbach and W Kutsch. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 1995.
- Strausfeld NJ, Nässel DR. Neuroarchitecture of the brain regions that subserve eyes of crustacea and insects pp 1-132 in H. Atrium (ed) *Handbook of Sensory Physiology. Vol II: Vision in Invertebrates*, Springer-verlag, Berlin, 1980.
- Takei K, Cai H, Ip YT, Levine M. Race: A drosophila homologue of the angiotensin converting enzyme. *Mechanisms of Development*, 51 (2-3): 157-168, 1995.
- Takei Y, Hirano T, Kobayashi H. Angiotensin and water intake in the Japanese eel, *Anguilla*

*japonica*. Gen Comp Endocrinol, 38: 466-475, 1979.

- Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y, Ishida J, Takimoto E, Yagami K, Fukamizu A, Murakami K. Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. J Biol Chem, 269: 31334-31337, 1994.
- Tensen CP, De Kleijn DP, Van Herp F. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormones from the lobster *Homarus americanus*. Eur J Biochem, 200 (1): 103-106, 1991.
- Terenius L. Opioid peptides, pain and stress, Prog Brain Res, 92: 375-383, 1992.
- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. Pharmacol Rev, 45: 205-251, 1993.
- Thorpe WH. The concepts of learning and their relation to those of instinct. Physiological Mechanism in Animal Behaviour Symposium. Soc Exp Biol 4: 387-408, 1963.
- Tomsic D, Maldonado H, Rakitin A. Morphine and GABA: effects on perception, escape response and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. Brain Res Bull, 26 (5): 699-706, 1991.
- Tomsic D, Maldonado H. Central effect of morphine pretreatment on short- and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. Pharmacol Biochem Behav, 36 (4): 787-793, 1990.
- Tomsic D, Massoni V, Maldonado H. Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs: ontogenic, ecological and opioid modulation correlates. J Comp Physiol A, 173: 621-633, 1993.
- Tomsic D, Pedreira ME, Romano A, Hermitte G, Maldonado H. Context-US association as a determinant of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. Ann Lear Behav, 26 (2): 196-209, 1998.
- Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. Cell, 79 (1): 35-47, 1994.
- Turrin MQA, Sawaya MI, Santos MCF, Veiga LV, Mantero F, Opocher G. Comparative Biochemistry Physiology, 101A: 803-806, 1992.
- Unnikrishnan MC, Subramaniam S, Glynnias MJ, Dasashiva SK, Husain A. Angiotensin II-forming activity in a reconstructed ancestral chymase. Science, 271: 502-505, 1996.
- Van Herp F, Bellon-Humbert C. CR Acad Sci Paris, 295 (III): 97-102, 1982.
- Van Kesteren RE, Smit AB, De Lange RP, Kits KS, Van Golen FA, Van Der Schors RC, De With ND, Burke JF, Geraerts WP. Structural and functional evolution of the vasopressin/oxytocin superfamily: vasopressin-related conopressin is the only member present in Lymnaea, and is involved in the control of sexual behavior. J Neurosci, 15 (9): 5989-5998, 1995.
- Van Kesteren RE, Tensen CP, Smit AB, van Minnen J, Kolakowski LF, Meyerhof W, Richter D, van Heerikhuizen H, Vreugdenhil E, Geraerts WP. Co-evolution of ligand-receptor pairs in the vasopressin/oxytocin superfamily of bioactive peptides. J Biol Chem 271: 3619-3626, 1996.
- Veltmar A, Culman J, Qadri F, Rascher W, Unger T. Involvement of adrenergic and angiotensinergic receptors in the paraventricular nucleus in the angiotensin II-induced vasopressin release. J Pharmacol Exp Ther, 263: 1253-1260, 1992.

- Wayner MJ, Chitwood R, Armstrong DL, Phelix C. Ethanol affects hypothalamic neurons projecting to the hippocampus and inhibits dentate granule cell LTP. *Alcohol*, 14: 1-7, 1997a.
- Wayner MJ, Phelix CF, Armstrong DL. Lateral Hypothalamic stimulation inhibits dentate granule cell LTP: Direct Connections. *Brain Res Bull*, 43 (1): 5-15, 1997b.
- Weisinger RS, Blair-West JR, Burns P, Denton DA, Tarjan E. Role of brain angiotensin in thirst and sodium appetite of rats. *Peptides*, 18 (7): 977-984, 1997.
- Wickham L, Desgroseillers L. A bradykinin-like neuropeptide precursor gene is expressed in neuron L5 of *Aplysia californica*. *DNA Cell Biol*, 10 (4): 249-258, 1991.
- Wiersma CAG, Roach JLM, Gltz RM. Neural Integration in the optic System, in *The Biology of Crustacea Vol. 4*. pp.1-31. Ed. Sandeman & Atwood. Academic Press, 1982.
- Wijffels G, Fitzgerald C, Gough J, Riding G, Elvin C, Kemp D, Willadsen P. Cloning and characterization of angiotensin-converting enzyme from the dipteran species, *Haematobia irritans exigua*, and its expression in the maturing male reproductive system. *European Journal of Biochemistry*, 237 (2): 414-423, 1996.
- Wilkes BM, Krim E, Mento PF. Evidence for a functional renin-angiotensin system in full-term fetoplacental unit. *Am J Physiol*, 249 (4 Pt 1): E366-373, 1985.
- Wilson J.X. The renin-angiotensin system in non-mammalian vertebrates. *Endoc Rev*, 5: 45-61, 1984.
- Winnicka MM, Braszko JJ. 6-OHDA lesions to the central amygdala abolish angiotensins facilitation of object recognition in rats. *Gen Pharmacol*, 29 (2): 239-243, 1997.
- Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Behav Rev*, 18 (1): 21-53, 1994.
- Wright JW, Harding JW. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Rev*, 25 (1): 96-124, 1997.
- Wright JW, Harding JW. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Rev*, 17: 227-262, 1992.
- Wright JW, Krebs LT, Stobb, J. W., and Harding, J. W., The angiotensin IV system: Functional implications, *Front. Neuroendocrinology*, 16: 23-52, 1995.
- Wright JW, Miller-Wing AV, Shaffer MJ, Higginson C, Wright DE, Hanesworth JM, Harding JW. Angiotensin II(3-8) (ANG IV) hippocampal binding: potential role in the facilitation of memory. *Brain Res Bull* 32: 492-502, 1993.
- Wustenberg D, Gerber B, Menzel R. Short communication: long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin. *Eur J Neurosci*, 10 (8): 2742-2745, 1998.
- Xu Z, Xinghong J. Drinking and Fos-immunoreactivity in rat brain induced by local injection of angiotensin I into the subfornical organ. *Brain Res*, 817 (1-2): 67-74, 1999.
- Yin JC, Tully T. CREB and the formation of long-term memory. *Curr Opin Neurobiol*, 6 (2): 264-268, 1996.
- Yoshimura Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front. Neuroendocrinol*, 18 (3): 247-291, 1997.

- Young LJ, Wang Z, Insel TR. Neuroendocrine bases of monogamy. *Trends Neurosci*, 21 (2): 71-5, 1998.
- Zubenko GA, Nixon RA. Mood-elevating effects of captopril in depressed patients. *Am J Psychiatry*, 141: 110-111, 1984.